

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Věra Křížová

ANALÝZA PRODUKTŮ REAKCÍ FTALALDEHYDU
S VYBRANÝMI AMINOKYSELINAMI

Analysis of reaction products of phthalaldehyde with selected
amino acids

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Radomír Čabala, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Miroslav Polášek, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2014.

Abstrakt

Tato práce se zabývá analýzou produktů reakcí ftalaldehydu s vybranými aminokyselinami pomocí spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. V případě jednoduchých aminokyselin (glycinu, glycin ethyl esteru, alaninu, α -aminomáselné kyseliny, valinu, leucinu a isoleucinu) vzniká vždy pouze jeden produkt s dihydroisoindolovou strukturou. Reakcí ftalaldehydu s aminokyselinami se dvěma aminoskupinami (lysinem, asparaginem, glutaminem a argininem) vznikají různé typy sloučenin. Hlavní produkty vznikají interakcí obou aminoskupin s jednou molekulou ftalaldehydu. Kromě toho vznikají také očekávané analogy dihydroisoindolů z reakcí ftalaldehydu s jednoduchými aminokyselinami, navíc není vyloučen vznik produktů obsahujících jednu molekulu aminokyseliny a dvě molekuly ftalaldehydu.

Produkty byly strukturně analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Produkty reakcí ftalaldehydu s α -aminomáselnou kyselinou, valinem, leucinem, isoleucinem a lysinem byly izolovány a dále byly podrobeny analýze za použití elektronové ionizace na přístroji sektorového typu s dvojitou fokusací a nukleární magnetické resonance. Zjištěné informace mají zásadní význam na aplikovatelnost využití ftalaldehydu jako detekčního činidla při fluorimetrických detekcích při analýze směsí primárních aminů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Klíčová slova: HPLC, hmotnostní spektrometrie

Abstract

This thesis focuses on analysis of reaction products of phthalaldehyde with selected amino acids using the combination of high-performance liquid chromatography with mass spectrometry. Only one product with dihydroisoindole structure is formed in the case of simple amino acids (glycine, glycine ethyl ester, alanine, α -aminobutyric acid, valine, leucine and isoleucine). Reactions of phthalaldehyde with amino acids with two amino groups (lysine, asparagine, glutamine and arginine) yield different types of compounds. Main products are formed by the interaction of both of the amino groups with one molecule of phthalaldehyde. Apart from this type of product, these reactions also result in formation of the expected analogous structures of dihydroisoindoles. Moreover, the formation of products containing one molecule of amino acid and two molecules of phthalaldehyde is not excluded.

The products were structurally analysed by the use of high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Reaction products of phthalaldehyde with

α -aminobutyric acid, valine, leucine, isoleucine and lysine were isolated and further analyses such as electron ionisation with double focusing sector analyser and nuclear magnetic resonance were performed. Pieces of information resulting from the analysis of reaction products of phthalaldehyde with amino acids are of significant importance to the use of phthalaldehyde as a detection reagents in analyses of mixtures of primary amines by high-performance liquid chromatography.

Key words: HPLC, mass spectrometry

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi za vysání tématu a svému konzultantovi Mgr. Miroslavu Poláškov, Ph.D. za trpělivou pomoc a cenné rady při zpracovávání této práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Zdeňku Tošnerovi, Ph.D. za zaznamenání a interpretaci NMR spekter a RNDr. Jiřímu Urbanovi, CSc. za poskytnutí standardu jednoho z produktů reakcí ftalaldehydu s aminokyselinami.

Obsah

Seznam zkratk.....	- 8 -
1. Úvod.....	- 9 -
2. Teoretická část.....	- 10 -
2.1. Ftalaldehyd	- 10 -
3. Experimentální část.....	- 15 -
3.1. Použité chemikálie.....	- 15 -
3.2. Použité přístroje.....	- 16 -
3.2.1. Hmotnostní spektrometr.....	- 17 -
3.3. Postup měření	- 18 -
3.3.1. HPLC	- 18 -
3.3.2. Hmotnostní spektrometrie.....	- 19 -
3.3.3. Nukleární magnetická rezonance (NMR)	- 21 -
3.4. Pracovní postupy	- 22 -
3.4.1. Příprava glycin ethyl esteru z glycin ethyl esteru hydrochloridu	- 22 -
3.4.2. Reakce OPA s AAs.....	- 22 -
3.5. Postup zpracování naměřených dat	- 23 -
4. Výsledky a diskuze.....	- 24 -
4.1. Reakce OPA s glycinem	- 24 -
4.2. Reakce OPA s glycin ethyl esterem	- 26 -
4.3. Reakce OPA s alaninem	- 30 -
4.4. Reakce OPA s α -aminomáselnou kyselinou.....	- 32 -
4.5. Reakce OPA s valínem.....	- 35 -
4.6. Reakce OPA s leucinem	- 38 -
4.7. Reakce OPA s isoleucinem.....	- 41 -
4.8. Reakce OPA s lysinem	- 44 -
4.9. Reakce OPA s asparaginem.....	- 51 -

4.10.	Reakce OPA s glutaminem	- 56 -
4.11.	Reakce OPA s argininem	- 61 -
4.12.	Reakce OPA se směsí AAs	- 65 -
5.	Závěr.....	- 72 -
	Seznam použité literatury	- 73 -

Seznam zkratek

2-ME	2-merkapt ethanol
3-MPA	3-merkaptopropionová kyselina
AA	aminokyselina (z anglického amino acid)
AAs	aminokyseliny (z anglického amino acids)
CID	kolizně indukovaná disociace (z anglického collision induced dissociation)
DIP	sonda přímého vstupu (z anglického direkt inlet probe)
DMSO-d ₆	deuterovaný dimethylsulfoxid
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem (z anglického electrospray ionization)
GC	plynová chromatografie (z anglického gas chromatography)
GTA	glutaraldehyd
HFBA	heptafluormáselná kyselina (z anglického heptafluorobutyric acid)
HPLC	vysoko-účinná kapalinová chromatografie (z anglického high-performance liquid chromatography)
MS	hmotnostní spektrometr (z anglického mass spectrometer)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
OPA	ftalaldehyd (odvozeno z <i>o</i> -phthalaldehyde)
RP	reverzní fáze (z anglického reverse phase)

1. Úvod

Ftalaldehyd je snadno komerčně dostupný dialdehyd, který je často využíván jako derivatizační činidlo při fluorimetrických detekcích aminokyselin po analýze vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií. Tato pre-column derivatizace je vhodná i pro rutinní analýzy. Využití nachází především v lékařství, kde je využívána k detekci aminokyselin v biologických vzorcích a jejich následné kvantifikaci. Jelikož některé aminokyseliny mohou sloužit jako markery různých onemocnění, existují studie zabývající se možností použít tuto metodu také k diagnostice. Dalším odvětvím, ve kterém se tato metoda detekce výrazněji uplatňuje, je potravinářský průmysl. I zde je derivatizace ftalaldehydem používána k detekci a také ke kvantifikaci primárních aminů v potravinách. I přes to, že je tato metoda hojně používána, nikdo se příliš nezabývá tím, jak vlastně ftalaldehyd s aminokyselinami reaguje a jaký může mít vznik různých produktů vliv na separaci nebo na následnou detekci, popř. kvantifikaci.

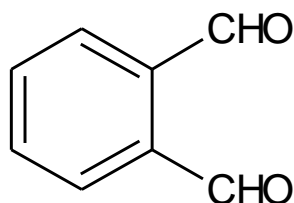
Kromě derivatizací aminokyselin při HPLC analýze je ftalaldehyd používán také jako širokospektrální dezinfekce. Nahradil tak svého méně uživatelsky přívětivého předchůdce glutaraldehyd. Oproti glutaraldehydu má ale i další výhody, například nepotřebuje před použitím aktivovat, srovnatelného baktericidního účinku dosahuje při mnohem nižších množstvích, působí na všechny druhy mikroorganismů a při lehce zásaditém pH ničí i endospory. Všeobecně se předpokládá, že lepší účinnost ftalaldehydu má spojitost s možností hydratace molekuly za vzniku 1,3-ftalandiolu. Díky tomu je mechanismus průchodu ftalaldehydu buněčnou stěnou bakterií mnohem jednodušší, a tak může ftalaldehyd působit zevnitř i zvenčí.

Cílem této práce je syntéza produktů reakce ftalaldehydu s vybranými aminokyselinami a jejich analýza za použití spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a tandemového hmotnostního spektrometru.

2. Teoretická část

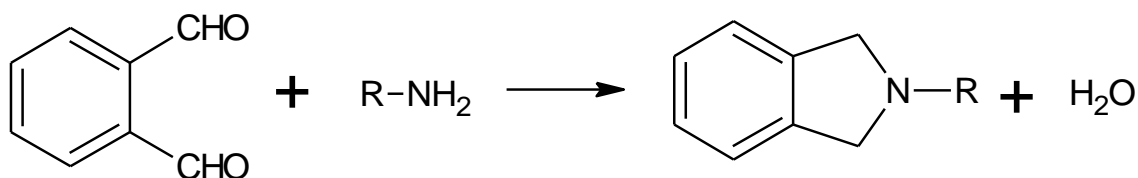
2.1. Ftalaldehyd

Ftalaldehyd, v literatuře také často nazýván jako *o*-ftalaldehyd (OPA) je aromatický dialdehyd s relativní molekulovou hmotností $134 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Při laboratorní teplotě existuje ve formě světle žlutého prášku, který může tvořit hrudky. Rozmezí bodu tání je $55 - 58 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a bod varu je roven $83 \text{ }^{\circ}\text{C}$ při $1,067 \text{ hPa}$. Jedná se o spíše nepolární sloučeninu ($\log P_{\text{n-oktanol/voda}} 0,934$). Je relativně netěkavý, díky čemuž je i relativně málo toxický. [1]



Obr. 2.1. Ftalaldehyd, alternativně také 1,2-benzendikarboxaldehyd nebo *o*-ftalový dikarboxaldehyd.

Ftalaldehyd je využíván jako reagens při fluorimetrických detekcích primárních aminů při analýze vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Přidává se jako pre-column derivatizační činidlo společně s 2-merkaptopethanolem (2-ME) [2, 3, 4, 5] nebo s 3-merkaptopropionovou kyselinou (3-MPA) [5], se kterými tvoří fluorescenční produkty. OPA společně s 2-ME nebo 3-MPA reaguje s aminokyselinami (AAs), popřípadě jinými primárními aminy, za vzniku isoindolových derivátů (viz obr. 2.2.). [3, 6, 7]



Obr. 2.2. Reakce OPA s primárním aminem za vzniku isoindolového derivátu. [3, 6, 7]

Dříve byla k analýze AAs používána iontově-výměnná chromatografie s post-column derivatizací ninhydrinem [2, 3, 4, 5], ale tato metoda ale byla časem nahrazena již zmíněnými citlivějšími metodami. Je možné také využití plynové chromatografie (GC), při které ale musejí být AAs zdlouhavě derivatizovány tak, aby byly dostatečně těkavé pro GC analýzu. Z tohoto důvodu je tato metoda nevhodná pro rutinní analýzy. [5]

Fluorimetrická detekce s použitím OPA je považována za vhodnou a efektivní metodu například ke kvantitativní analýze AAs v biologických vzorcích, jako třeba v mozkomíšním moku, což je velmi přínosné k diagnostice chorob postihujících nervovou soustavu, jako je např. aseptická meningitida. [2] Dále je tato metoda často využívána v potravinářském průmyslu ke stanovení nejen AAs, ale také biogenních aminů, např. putrescinu, kadaverinu [3], či močoviny, která je prekurzorem ethylkarbamátu, významného karcinogenu, mutagenu a teratogenu [8].

OPA je také využíván jako vysoce účinné dezinfekční činidlo v lékařských zařízeních. Používá se především pro dezinfekci endoskopů, bronchoskopů, sond, katetrů atd. [9, 10] Pomalu tak nahrazuje glutaraldehyd (GTA), jehož použití s sebou nese mnoho nevýhod. GTA musí být před použitím aktivován. [11, 12] GTA je těkavější a tím pádem i toxičtější než OPA. Díky tomu je méně uživatelsky přívětivější k personálu, který může trpět podrážděním očí, kůže a sliznic v dýchacím traktu. Navíc je GTA podezřelý z mutagenity, karcinogenity a teratogenity. [11, 13, 14, 15] GTA působí relativně pomalu na mykobakterie a některé z nich si na něj dokonce vyvinuly rezistenci. [13] Na rozdíl od GTA působí OPA rychleji při nižších koncentracích (v případě GTA je obvykle používán 2% roztok, roztok OPA bývá 0,5%). [10, 16] GTA navíc zanechává na nástrojích usazeniny, které nepříznivě reagují se sliznicemi pacientů. [9] GTA neprochází buněčnou stěnou patogenů tak snadno jako OPA. [17, 18]

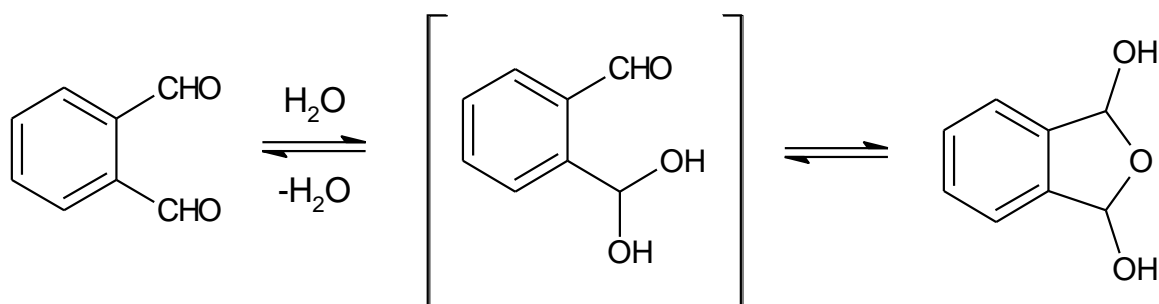
OPA účinkuje na mykobakterie, gram negativní i gram pozitivní bakterie [16], viry (především virus způsobující hepatitidu typu B) [14, 19] a biofilmy [20]. Při zvýšeném pH (pH 8, obvykle používán při pH 7,5) působí i na endospory. [10, 11] Při působení dezinfekčního činidla na endospory hraje ale také roli stav jejich vnější vrstvy (do poškozených endospor proniká OPA snadněji) a stadium sporulace. Rezistence na OPA se u endospor objevuje až po iniciaci syntézy dipikolinové kyseliny. [13, 18, 21]

Přesný mechanismus působení OPA byl zkoumán na gram negativních bakteriích, konkrétně na *Pseudomonas fluorescens*. Antimikrobiální účinek OPA závisí na koncentraci, na čase působení [12] a na pH [11, 17]. OPA chemicky reaguje s molekulami v membráně, čímž způsobuje stabilizaci její struktury a změny v hydrofobicitě a permeabilitě membrány. Při koncentracích od 100 mg/l OPA způsobuje prodloužení bakterií a následně narušuje syntézu peptidoglykanu, stavební jednotky buněčné stěny bakterií. To má za následek zastavení buněčného dělení a smrt

buňky. Při koncentracích OPA nad 500 mg/l může docházet i k poškození DNA. [12]

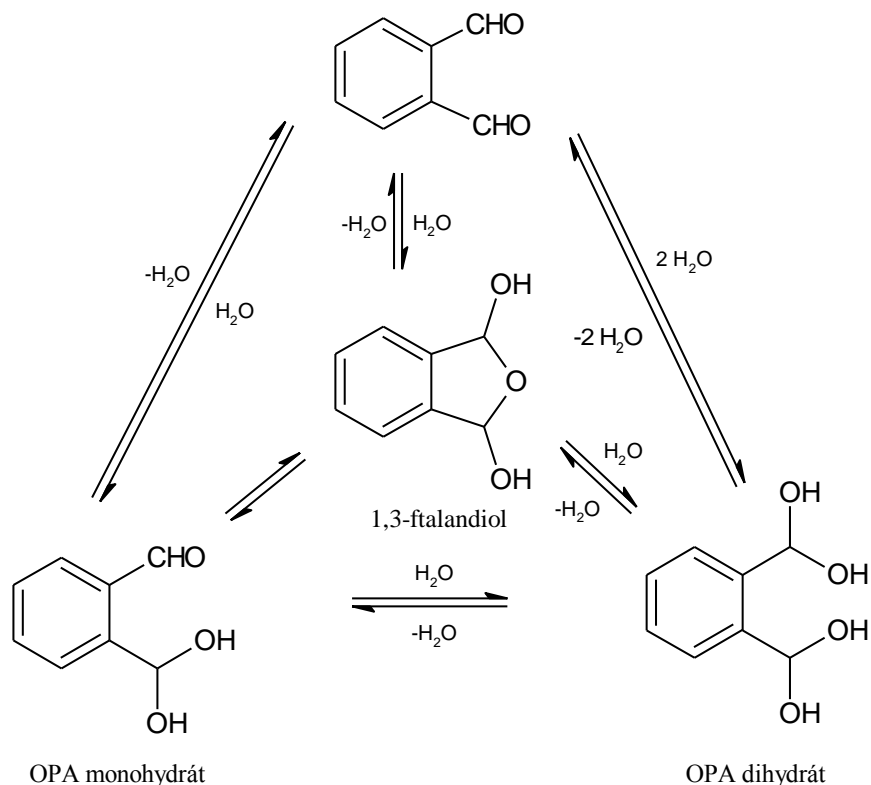
OPA reaguje s volnými aminoskupinami peptidových řetězců a tím inhibuje případnou enzymatickou funkci proteinů. [15, 16] Není vyloučeno, že inhibuje zcela konkrétní enzym metabolického aparátu buněk. [12] OPA může reagovat pouze s primárními aminy, takže v případě peptidů reaguje pouze s postranními řetězci lysinu a argininu, popř. s N-terminální doménou peptidu. [17] OPA navíc reaguje pouze s neprotonizovanou aminoskupinou primárních aminů, proto lépe účinkuje v alkalickém prostředí. Vliv interferujících látek na působení OPA na patogeny není příliš zásadní. [12, 14, 16]

Aldehydová skupina v poloze *ortho* umožňuje hydrataci a hydratovaná forma následně cyklizuje na 1,3-ftalandiol, který je ve vodném roztoku stabilizován vodíkovými můstky s molekulami vody a vznikem pětičlenného heterocyklu (viz obr. 2.3.). Tvorba polárního 1,3-ftalandiolu také vysvětluje částečnou rozpustnost OPA ve vodě a jeho relativně nízkou tenzi par. Rozpustnost OPA je i přes vznik polárního 1,3-ftalandiolu pouze částečná, jelikož 1,3-ftalandiol tvoří ve vodných roztocích micely. [22]



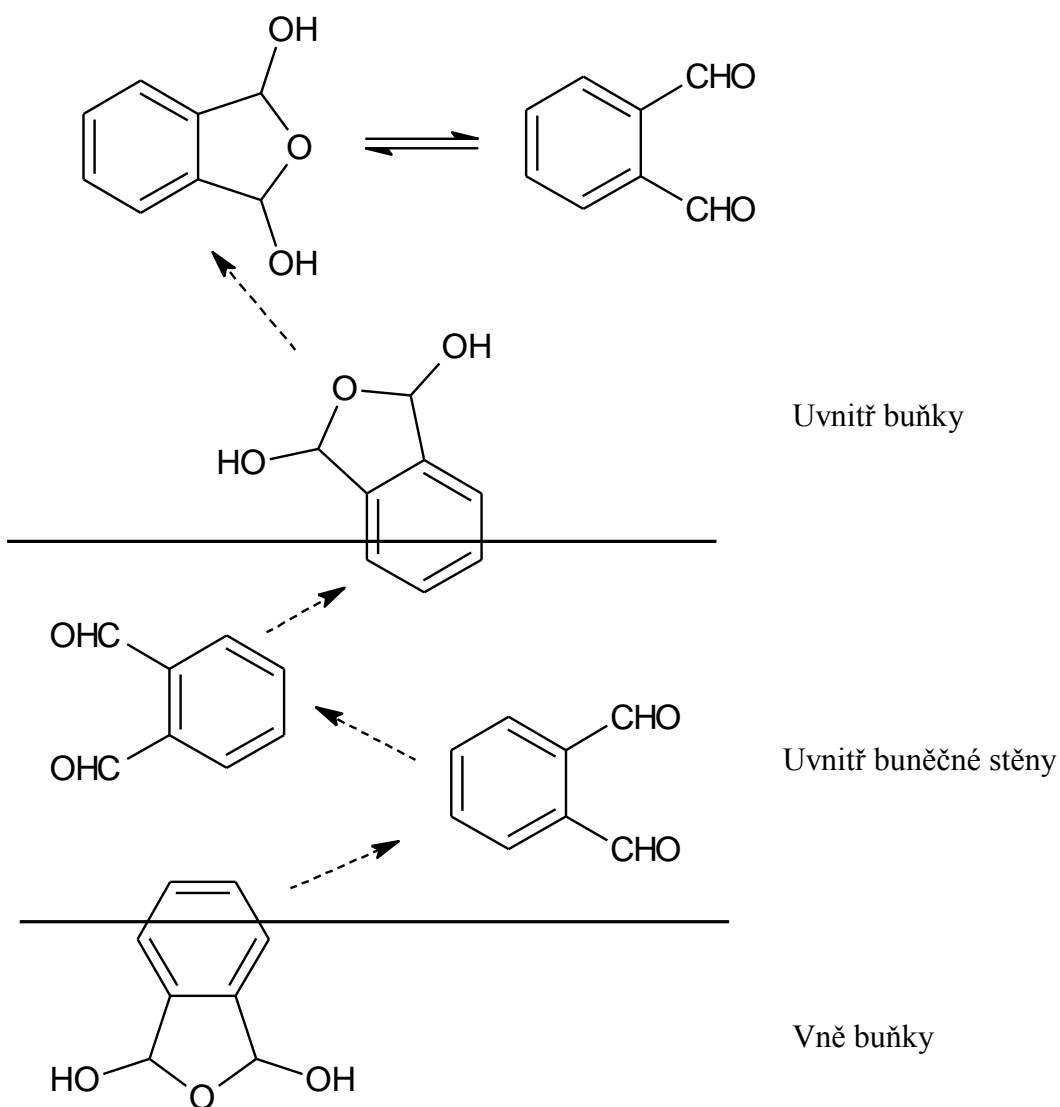
Obr. 2.3. Přechod OPA na 1,3-ftalandiol ve vodném roztoku. [22]

Kromě 1,3-ftalandiolu mohou ve vodných roztocích vznikat také monohydrát a dihydrát OPA. 1,3-ftalandiol se ve vodných roztocích vyskytuje nejčastěji a může vznikat také z OPA monohydrátu a OPA dihydrátu (viz obr. 2.4.). [22]



Obr. 2.4. OPA je hydrofobní sloučenina, jejíž aldehydové skupiny jsou ve vodném roztoku hydratovány. V největší míře vzniká 1,3-ftalandiol, méně často dochází ke vzniku OPA monohydrátu a dihydrátu. [22]

Tyto struktury mohou přecházet jedna ve druhou a to usnadňuje pohyb OPA přes biologické membrány. Bakteriální buněčnou stěnu si lze představit jako sérii za sebou jdoucích hydrofilních a hydrofobních vrstev. OPA se při transportu buněčnou stěnou musí dostat přes vnější a vnitřní membránu, kterou tvoří fosfolipidové dvojvrstvy. Mezi nimi se nachází periplasmatický prostor, který je tvořen peptidoglykanem. OPA se pak podle potřeby hydratuje a zase dehydratuje podle polarity vrstvy, do které vstupuje. Obr. 2.5. zjednodušeně popisuje průchod OPA bakteriální buněčnou stěnou, která je zde znázorněna vnější a vnitřní hydrofilní membránou a hydrofobním středem. Vně buněčné stěny bakterií se OPA nachází ve formě 1,3-ftalandiolu. Díky přeměně 1,3-ftalandiolu na OPA při kontaktu benzenového jádra s buněčnou stěnou se OPA snadno dostává do její lipofilní části. Poté se dostává se na druhou stranu bariéry a do cytoplasmy bakterie, kde může existovat v obou formách a jako OPA i baktericidně působit. Hnací silou tohoto procesu je koncentrační gradient. [22]



Obr. 2.5. Průchod OPA buněčnou stěnou. Vnější prostředí buňky je hydrofilní, a tak se OPA nachází ve formě 1,3-ftalandiolu. Uvnitř buněčné stěny je prostředí hydrofobní a OPA se vrací do své původní dehydratované formy. Poté znova projde ve formě 1,3-ftalandiolu do buňky, kde jsou obě formy v rovnováze. [22]

3. Experimentální část

3.1. Použité chemikálie

Messer Technogas, ČR

Dusík (99,996%)

Argon (99,999%)

Sigma-Aldrich, USA

Triethylamin (> 99,5%)

Acetontril (\geq 99,9%)

Sigma, USA

Ftalaldehyd (\geq 97%)

L-Arginin (\geq 99,5%)

L-Asparagin (\geq 98%)

L-Glutamin (\geq 99,5%)

Aldrich, USA

L- α -aminomáselná kyselina (\geq 99%)

Dimethyl sulfoxid-d₆ (99,96% D)

D₂O (99,9% D)

Fluka, USA

Heptafluormáselná kyselina (\geq 99,5%)

Glycin ethyl ester hydrochlorid (\geq 98,0%)

Perfluorkerosen (low boiling, čistota neuvedena)

Lachema, ČR

DL-Leucin (čistý)

Glycin (p. a.)

DL-Valin (čistota neuvedena)

DL-Isoleucin (čistý)

Reanal, Maďarsko

L- α -Alanin (čistota neuvedena)

Loba Feinchemie, Rakousko

L-Lysin (čistý)

Lachner, ČR

Chloroform (99,77%)

Diethylether (99%)

3.2. Použité přístroje

HPLC

Binary HPLC Pump 1525 μ , Waters, USA

Dual λ Absorbance Detector 2487, Waters, USA

Hmotnostní spektrometr

Quattro Premier XE, Waters, USA

ZAB2-SEQ, VG Analytical, UK

Nukleární magnetická rezonance

Bruker Avance III 600 MHz, USA

Sonikátor

2510 Branson, USA

Magnetická míchačka

MR Hei-Standard, Heidolph, Německo

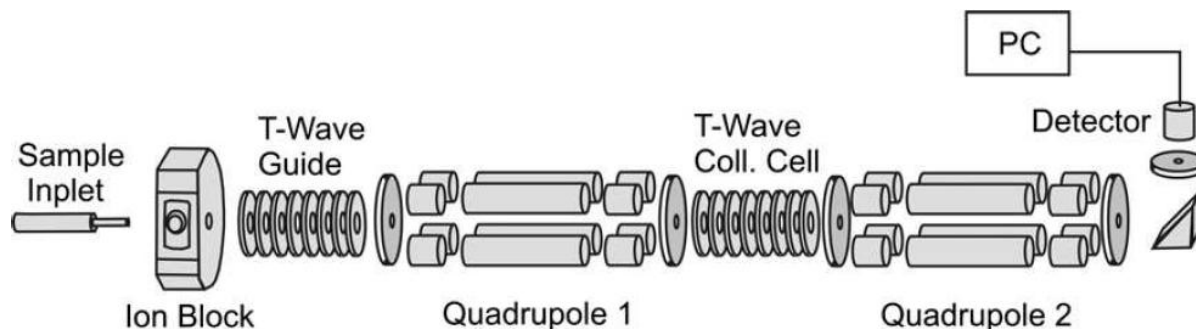
MR 1000, Heidolph, Německo

Analytické váhy

New Classic MS, Mettler Toledo, Švýcarsko

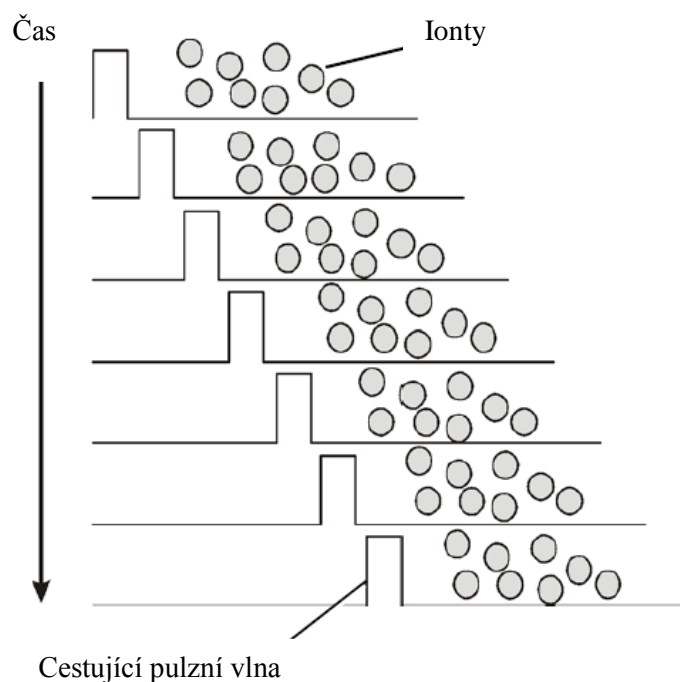
3.2.1. Hmotnostní spektrometr

Přístroj Quattro Premier XE od firmy Waters je tandemový hmotnostní spektrometr (MS/MS) vybaven kvadrupólem a kolizní celou typu T-Wave™. Schéma přístroje viz obr. 3.1.



Obr. 3.1. Schéma tandemového hmotnostního spektrometru s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem a kolizní celou typu T-Wave™. [23]

T-Wave™ („travelling wave“) je složen ze soustavy kovových destiček, na které je vkládáno radiofrekvenční napětí (RF). Na sousední destičky je vkládáno RF napětí o opačné polaritě. Aplikací přídavného přechodného stejnosměrného napětí je v tomto zařízení vytvářena napěťová vlna, která se jím pohybuje. Na této vlně pak „surfují“ ionty, čímž se urychluje jejich průchod dál do kvadrupólového analyzátoru (viz obr. 3.2.). [24]



Obr. 3.2. Urychlení iontů v kolizní cele T-Wave™. [24]

Při přímém nástřiku je vzorek do přístroje dávkován stříkačkou Hamilton. Díky ionizaci za atmosférického tlaku (elektrosprej (ESI) nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku) je možné i spojení s HPLC.

Po ionizaci jsou ionty nasměrovány do zařízení „T-Wave guide“. To slouží k transportu iontů do prvního kvadrupólu, kde jsou analyzovány podle m/z . Pokud zaznamenáváme hmotnostní spektra zdrojových iontů (MS mód), slouží kolizní cely a druhý kvadrupól jen jako RF zařízení k transportu iontů do detektoru. Je možné použít ale několik dalších módů měření se zapojením kolizní cely a druhého kvadrupólu. Jsou tak například zaznamenávány kolizně indukované disociace (CID). V kolizní cele ionty o vybrané m/z interagují s kolizním plynem a druhým kvadrupólem jsou zaznamenávány jejich fragmenty. Dále lze také použít „multiple reaction monitoring“, nebo „selected ion recording“ módy. [24]

3.3. Postup měření

3.3.1. HPLC

Produkty reakce OPA s AAs byly nejprve podrobeny analýze HPLC na reverzní fázi (RP). Byla použita kolona C18 (Hypersil BDS), 150×30 mm, 3 μ m (Thermo Scientific, USA). Objem dávkovací smyčky byl 5 μ l. Při analýze HPLC byly použity dvě mobilní fáze: voda s přídavkem 0,1% heptafluormáslé kyseliny (HFBA), která slouží jako iontově párové činidlo [25] (A) a čistý acetonitril (B). Byla použita kombinace isokratické a gradientové eluce, viz tabulka č. 3.1. Výsledný chromatogram byl zaznamenán UV detektorem při $\lambda = 280$ nm. Analýza probíhala při teplotě 23 °C.

Čas [min]	A [%]	B [%]	Průtok [ml/min]
5	100	0	0,5
20	50	50	0,5
30	50	50	0,5
32	100	0	0,5
40	100	0	0,5

Tab. 3.1. Eluční schéma použité při RP-HPLC analýze na koloně C18 (Hypersil BDS), 150×30 mm, 3 μ m (Thermo Scientific, USA).

Směsi AAs byly dále analyzovány na koloně Acclaim™ HILIC-10, 150x3 mm, 3 µm (Thermo Scientific, USA). Pro analýzu byly opět použity dvě mobilní fáze: voda s přídavkem 5 mmol octanu amonného (A) a čistý acetonitril (B). I v tomto případě byla použita kombinace isokratické a gradientové eluce, ovšem eluční schémata se pro obě směsi lišila. Schéma eluce pro reakční směs jednoduchých AAs viz tabulka 3.2. Eluční schéma pro směs složitějších AAs je popsáno v tabulce 3.3. Obě analýzy probíhaly při teplotě 23 °C.

Čas [min]	A [%]	B [%]	Průtok [ml/min]
2	10	90	0,5
15	30	70	0,5
17	30	70	0,5
18	10	90	0,5
30	10	90	0,5

Tab. 3.2. Eluční schéma použité při HPLC analýze reakční směsi jednoduchých AAs na koloně Acclaim™ HILIC-10, 150x3 mm, 3 µm (Thermo Scientific, USA).

Čas [min]	A [%]	B [%]	Průtok [ml/min]
2	10	90	0,5
15	30	70	0,5
17	30	70	0,5
18	10	90	0,5
30	10	90	0,5

Tab. 3.3. Eluční schéma použité při HPLC analýze reakční směsi složitějších AAs na koloně Acclaim™ HILIC-10, 150x3 mm, 3 µm (Thermo Scientific, USA).

Jednotlivé chromatogramy ve výsledkové části jsou od sebe odlišeny uvedením poznámky RP nebo HILIC v popisu obrázku.

3.3.2. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr (Quattro Premier XE) byl použit jak v zapojení s HPLC, tak s dávkováním přímým nástřikem. Pro ionizaci byl použit ESI v kladném módu. Pro zapojení MS s HPLC bylo měřeno při cone 50 V, teplotě desolvatace 300 °C a průtoku desolvatačního plynu (N₂) 500 l.h⁻¹. Spektra byla zaznamenávána

v kontinuálním módu.

V případě přímého nástřiku byla nejprve zaznamenávána zdrojová spektra při conech 50 V, 30 V a 20 V. Teplota desolvatace 200 °C, rychlost průtoku desolvatačního plynu (N_2) $100 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$ a rychlost dávkování $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Porovnáním spekter bylo následně rozhodnuto, při kterém cone budou měřena CID spektra (bylo vybíráno spektrum, kde byl pík produktu reakce OPA s danou aminokyselinou (AA) nejintenzivnější). Při měření CID spekter byl používán jako kolizní plyn argon (o průtokové rychlosti $0,40 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlaku okolo $1\cdot 10^{-2} \text{ m bar}$) a kolizní energie (E_{col}) byla volena na základě míry fragmentace vybraného iontu. Některé AAs tvořily s OPA více produktů, jejichž kolizní spektra byla také zaznamenána. Jednotlivé hodnoty cone a kolizních energií jsou shrnuty v tabulce 3.4.

AA	Produkt					
	[OPA + AA - H_2O]		[OPA + AA - $2\text{H}_2\text{O}$]		[AA + 2OPA]	
	Cone [V]	E_{col} [V]	Cone [V]	E_{col} [V]	Cone [V]	E_{col} [V]
Glycin	20	15	---	---	---	---
Valin	20	15	---	---	---	---
Alanin	20	15	---	---	---	---
Leucin	20	15	---	---	---	---
Isoleucin	30	15	---	---	---	---
Glycin ethyl ester	20	15	---	---	---	---
Lysin	20	15	50	20	20	20
Asparagin	50	20	50	20	---	---
Glutamin	50	20	30	20	---	---
Arginin	50	20	50	20	---	---
α -aminomáselná kyselina	20	15	---	---	---	---

Tab. 3.4. Souhrn podmínek měření kolizních spekter jednotlivých produktů reakcí OPA s AAs.

V případě produktů, které se podařilo izolovat, byla zaznamenána také hmotnostní spektra s použitím elektronové ionizace (EI MS) na přístroji sektorového typu s dvojitou fokusací ZAB2-SEQ. Ke kalibraci přístroje byl použit perfluorkerosen.

Spektra byla zaznamenávána při 70 eV, 50 μ A a 200 °C. Byla použita sonda přímého vstupu (DIP), ve které byl vzorek vyhříván od 35 °C do optimální teploty pro odpařování daného produktu (viz tab. 3.5.). Teplota byla postupně zvyšována po 20 stupních.

Produkt	Konečná teplota DIP [°C]
OPA + α -aminomáselná kyselina	150
OPA + valin	160
OPA + leucin	200
OPA + isoleucin	140
OPA + lysin	270

Tab. 3.5. Konečné teploty DIP pro jednotlivé produkty reakcí OPA s AAs.

3.3.3. Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Byla zaznamenána ^1H i ^{13}C (APT) NMR spektra produktů, které se podařilo izolovat z reakčních směsí. Absolutní přiřazení bylo provedeno na základě trojrozměrných spekter metodami COSY, HMBC a HSQC. Jako rozpouštědla byla použita těžká voda, popř. deuterovaný dimethylsulfoxid (DMSO- d_6). Použitá rozpouštědla viz tab. 3.6.

Produkt reakce	Rozpouštědlo
OPA + α -aminomáselná kyselina	DMSO- d_6
OPA + valin	DMSO- d_6
OPA + leucin	DMSO- d_6
OPA + isoleucin	DMSO- d_6
OPA + lysin	D ₂ O

Tab. 3.6. Rozpouštědla použitá při NMR analýze jednotlivých produktů reakcí OPA s AAs.

3.4. Pracovní postupy

3.4.1. Příprava glycin ethyl esteru z glycin ethyl esteru hydrochloridu

14 mmol glycin ethyl ester hydrochloridu bylo suspendováno v 10 ml chloroformu. Za stálého míchání bylo přikapáváno 14 mmol triethyl aminu rozpuštěného v 10 ml chloroformu. Směs byla míchána přes noc (cca 18 hodin) a poté byla krátce zahřívána ve vodní lázni, dokud chloroform nedosáhl bodu varu (61,2 °C). Po vychladnutí byl chloroform odpařen a takto získaná bílá pevná látka byla následně rozmíchána v 50 ml diethyletheru. Směs byla poté zfiltrována a zbylý triethyl amin hydrochlorid byl promyt ještě 10 ml diethyletheru. Odpařením diethyletheru byl získán glycin ethyl ester ve formě světle žlutého oleje. [26]

3.4.2. Reakce OPA s AAs

Byly připraveny roztoky OPA a příslušné AA o látkovém množství 0,5 mmol. OPA byl vždy rozpouštěn ve 20 ml a AA v 15 ml deionizované vody. Roztoky byly následně smíchány a z reakční směsi byly postupně odebírány frakce po 40 minutách (doba trvání jedné HPLC analýzy). První vzorek byl vždy odebrán v čase 0 minut. Jednotlivé vzorky byly analyzovány na RP-HPLC.

Reakční směsi OPA s valinem, isoleucinem, α -aminomáselnou kyselinou a glycin ethyl esterem bylo potřeba filtrovat z důvodu vzniku sraženiny.

Po úplném zreagování výchozích látek, které bylo ověřeno analýzou RP-HPLC za stejných podmínek, byla přímým nástřikem zaznamenána CID spektra produktů. V roztocích produktů OPA s valinem, leucinem, isoleucinem a α -aminomáselnou kyselinou se vytvořily krystaly, které byly z reakčních směsí izolovány a uschovány pro další měření. Reakční směs OPA s Lys byla odpařena a vzniklý prášek taktéž uchován. Všechny získané pevné vzorky byly analyzovány NMR a EI MS.

Následně byly provedeny reakce OPA se směsí AAs. AAs byly rozděleny do dvou skupin podle toho, zda při reakci s OPA vzniká jeden, nebo více produktů. První směs tedy obsahovala glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin a α -aminomáselnou kyselinu. Všechny AAs o látkovém množství 0,05 mmol byly rozpuštěny v jednom roztoku o objemu 15 ml. Následně byl roztok AAs přimíchán k 0,3 mmol roztoku OPA o objemu 20 ml. Z reakční směsi byly opět odebírány vzorky po 40 minutách počínaje časem 0 minut a analyzovány RP-HPLC. Druhá směs obsahovala AAs lysin, asparagin,

glutamin a arginin. Stejně jako v předchozím případě byly tyto AAs o látkovém množství 0,05 mmol rozpuštěny v 15 ml deionizované vody a přimíchány k 20 ml 0,2 mmol roztoku OPA. Reakční směs byla odebírána ve čtyřicetiminutových intervalech počínaje v čase 0 minut a analyzována pomocí RP-HPLC. Obě souhrnné reakční směsi byly po úplném zreagování analyzovány také na koloně Acclaim™ HILIC-10.

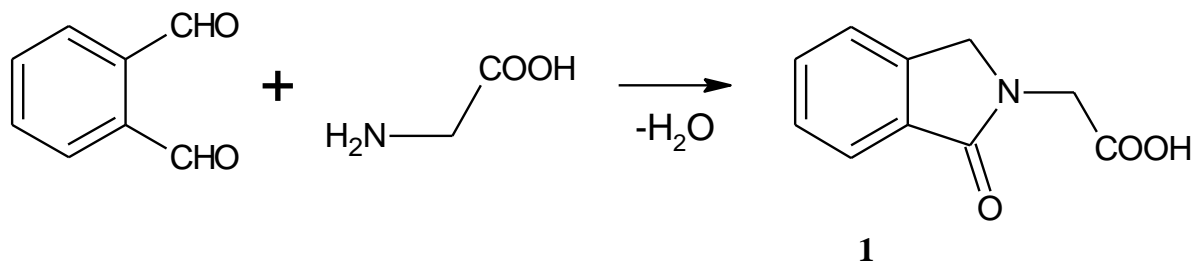
3.5. Postup zpracování naměřených dat

K záznamu měřených dat byl použit software MassLynx ve verzi 4.1 (Waters). V případě EI MS byla data zaznamenána softwarem MASPEC II³² (MasCom GmbH). Ke zpracování dat byl použit tabulkový editor MagicPlot (MagicPlot Systems, LLC).

4. Výsledky a diskuze

4.1. Reakce OPA s glycinem

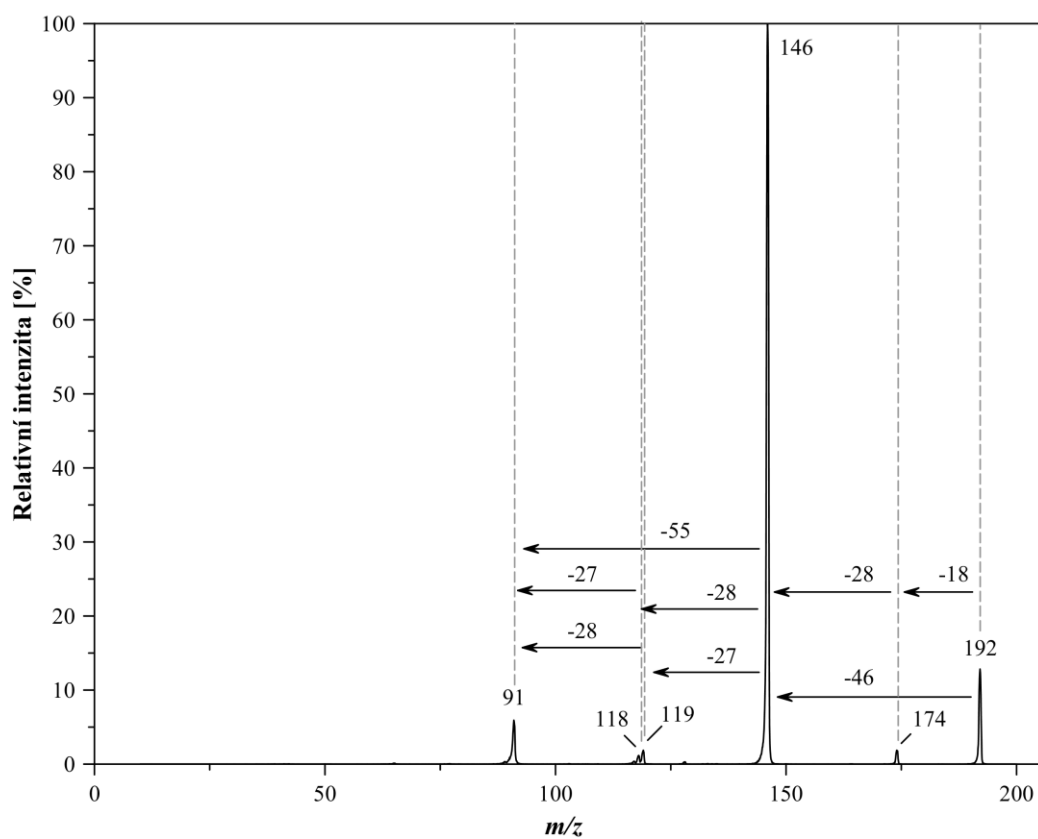
Reakcí OPA s glycinem vzniká 2-(1-oxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)octová kyselina (**1**), jejíž struktura je znázorněna na obr. 4.1.



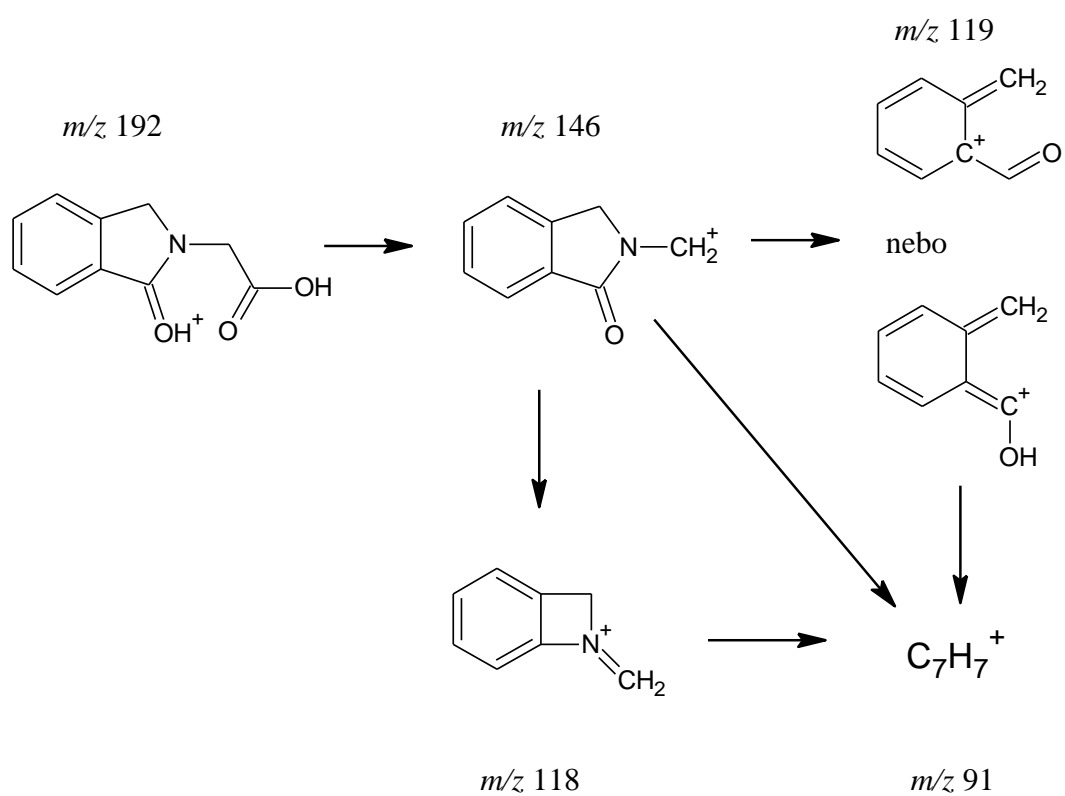
Obr. 4.1. Reakce OPA s glycinem.

Produktem této reakce je známá, v literatuře charakterizovaná sloučenina. [27, 28] **1** je dráždivá látka s bodem tání 224 – 226°C. [27]

Relativní molekulová hmotnost produktu je 191. V hmotnostních spektrech měřených v kladném módu tedy vidíme protonovanou molekulu m/z 192. Nejintenzivnějším iontem CID spektra (viz obr. 4.2.) **1** je fragment s m/z 146, který vzniká ztrátou mravenčí kyseliny z iontu m/z 192. Protonovaná molekula m/z 192 ztrácí HCOOH buď v jednom kroku, za přímého vzniku fragmentu m/z 146, nebo ve dvou krocích. V druhém případě protonovaná **1** ztrácí molekulu vody za vzniku fragmentu m/z 174 a následně CO. Fragment m/z 146 je poměrně stabilní díky isoindolové struktuře. Nicméně i tato poměrně stabilní struktura může dodáním dostatečného množství energie dále fragmentovat, a tak se z iontu m/z 146 mohou v relativně malé míře odštěpovat neutrální molekuly HCN, nebo CO za vzniku fragmentů m/z 119, resp. m/z 118. Fragment m/z 146 i fragmenty m/z 119 a m/z 118 se mohou dále štěpit za vzniku iontu m/z 91, který představuje směs tropyliu a benzyliu. CID spektrum produktu není v rozporu s navrženou strukturou. Schéma fragmentace viz obr. 4.3.

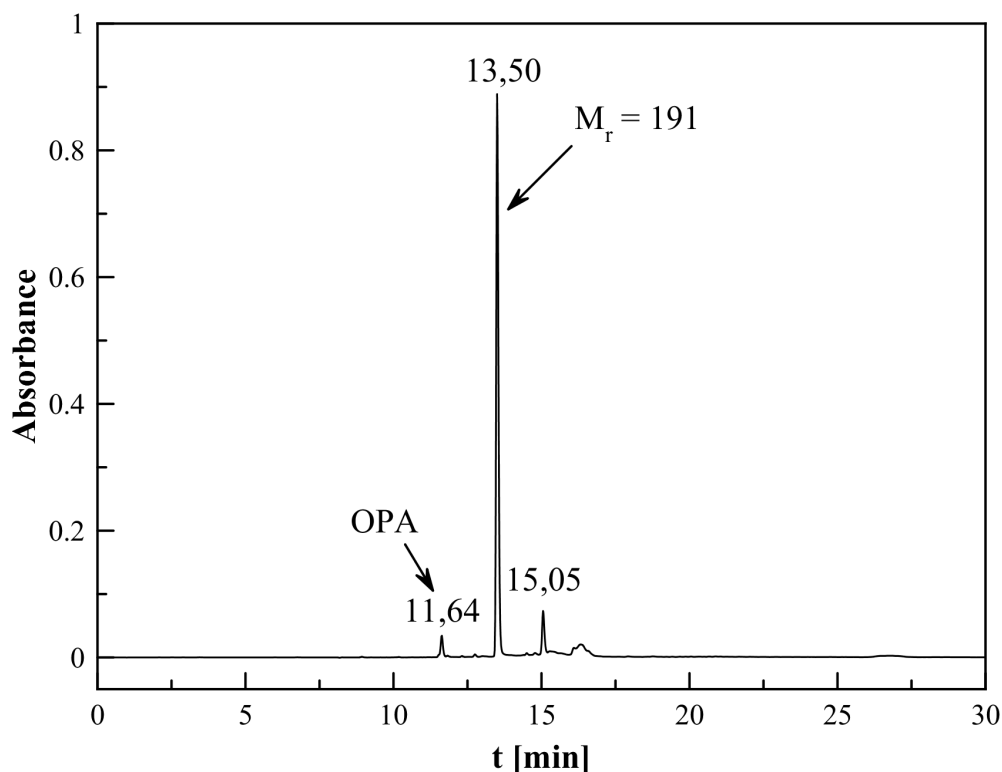


Obr. 4.2. CID spektrum protonované molekuly 1.



Obr. 4.3. Schéma fragmentace protonované molekuly 1.

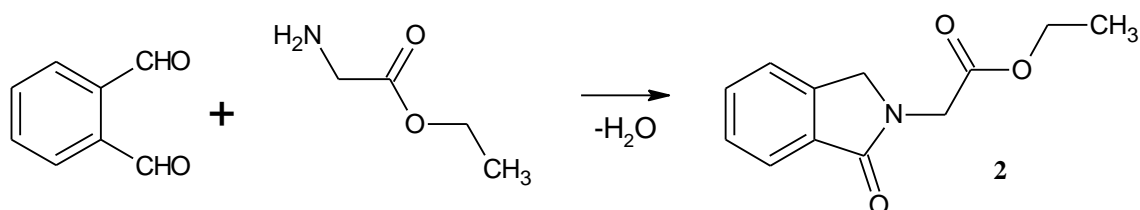
Analýzou HPLC bylo potvrzeno, že reakcí OPA s glycinem vzniká pouze jeden produkt. Chromatogram viz obr. 4.4. Retenční čas **1** je 13,5 min. Pík s retenčním časem 11,64 min patří nezreagovanému zbytku OPA. Pík objevující se v čase 15,05 min nebylo možno identifikovat, pravděpodobně se jedná o nečistotu pocházející z reakční směsi popř. z chromatografu.



Obr. 4.4. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s glycinem. Pík s retenčním časem 13,5 min patří **1**.

4.2. Reakce OPA s glycin ethyl esterem

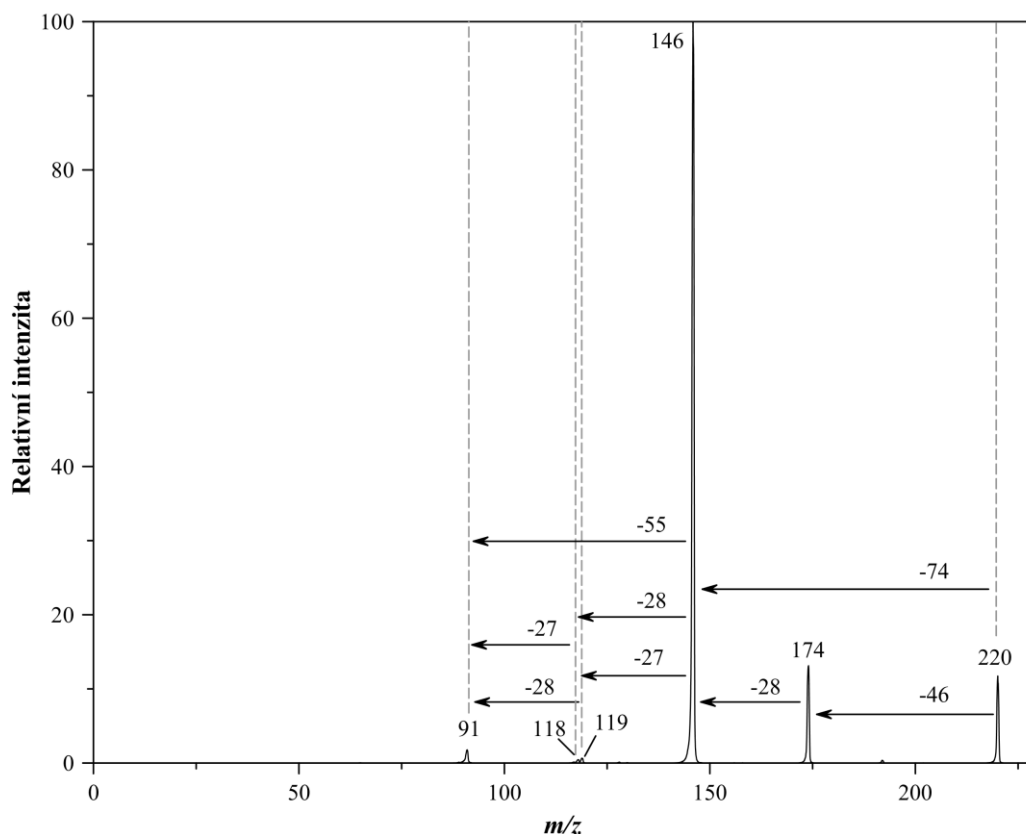
Reakcí OPA s glycin ethyl esterem vzniká 2-(1-oxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)ethyl acetát (**2**). Struktura viz obr. 4.5.



Obr. 4.5. Reakce OPA s glycin ethyl esterem.

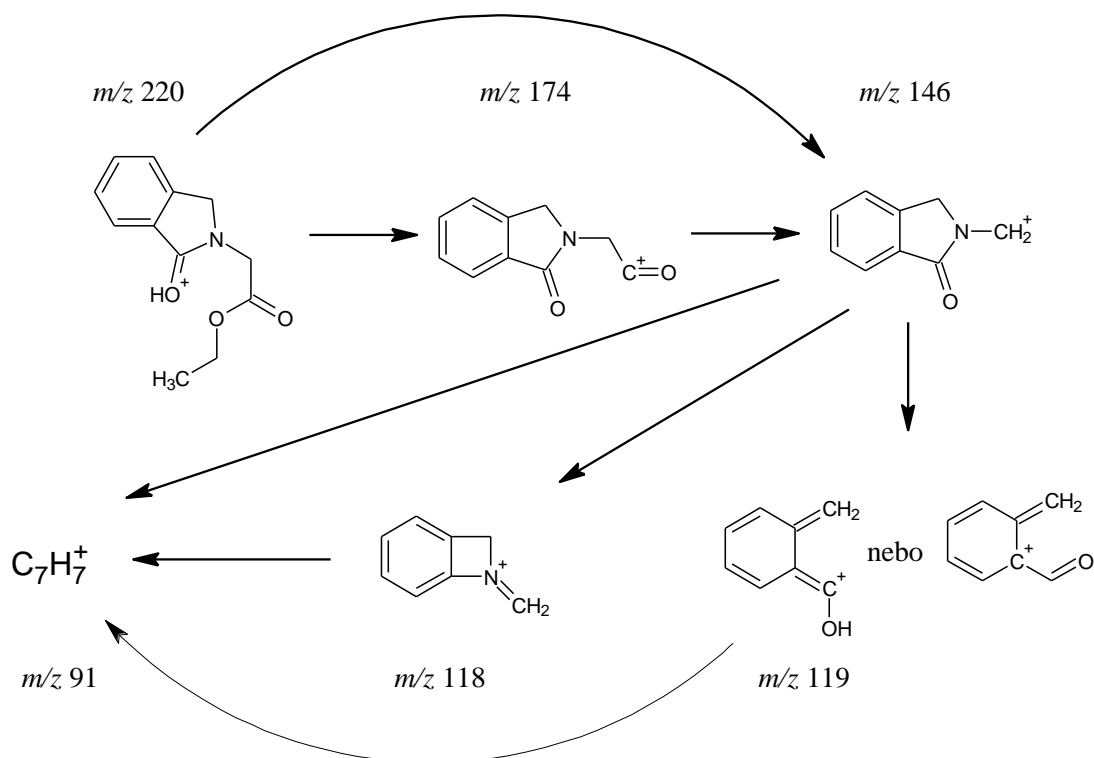
Produkt reakce **2** má relativní molekulovou hmotnost 219, v CID spektru produktu měřeného v kladném módu (viz obr. 4.6.) tedy pozorujeme protonovanou

molekulu s m/z 220.



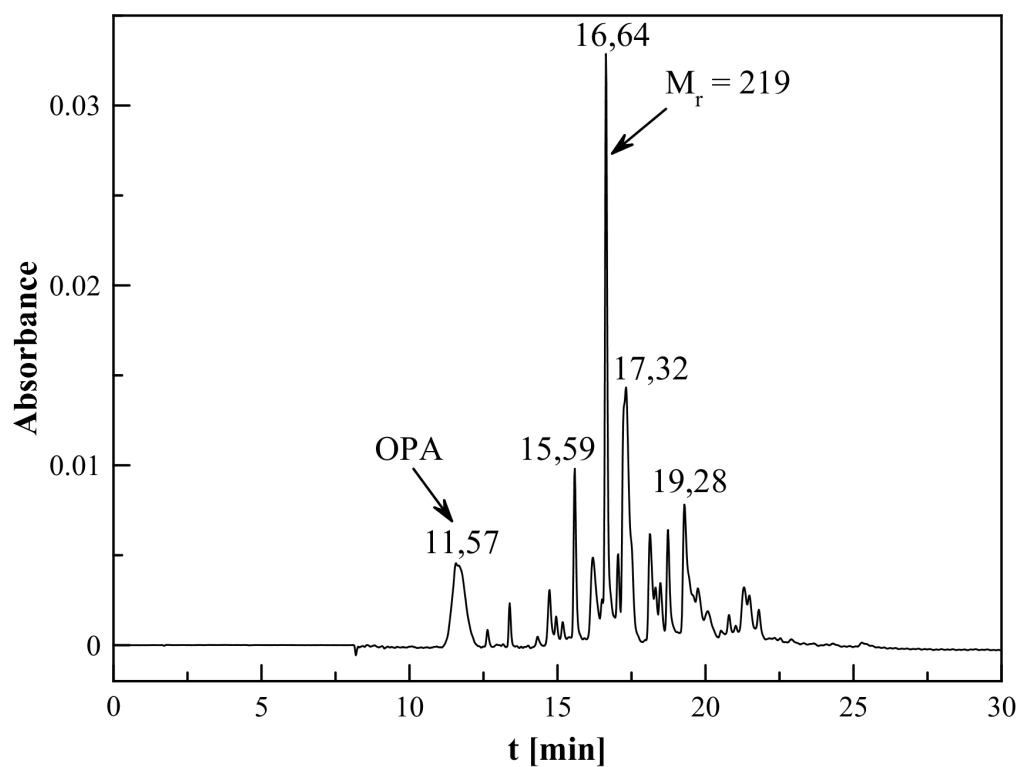
Obr. 4.6. CID spektrum protonované molekuly **2**.

Získané CID spektrum není v rozporu s navrženou strukturou produktu reakce OPA s glycin ethyl esterem. Fragmentace **2** je analogická fragmentaci **1**. Nejintenzivnějším píkem spektra je také m/z 146. Ten může vznikat v jednom, nebo ve dvou krocích. Ion m/z 220 buď v prvním kroku ztrácí molekulu etanolu za vzniku fragmentu s m/z 174 a v druhém CO, nebo může naráz ztrácet ethyl ester kyseliny mravenčí. Ion m/z 174 je ale v případě **2** intenzivnější, než v případě **1**. To je způsobeno tím, že z **1** se odštěpuje pouze molekula mravenčí kyseliny, která si s sebou odnáší méně energie než molekula etanolu z **2**. Iontu m/z 174 tedy v tomto případě zbývá méně energie pro další fragmentaci. Z iontu m/z 146 pak mohou dále vznikat fragmenty s m/z 119 a m/z 118 za ztráty HCN, resp. CO. Oba fragmenty m/z 119 a m/z 118 se stejně jako v případě **1** dále štěpí za vzniku směsi tropyliu a benzyliu s m/z 91. Schéma fragmentace **2** viz obr. 4.7.

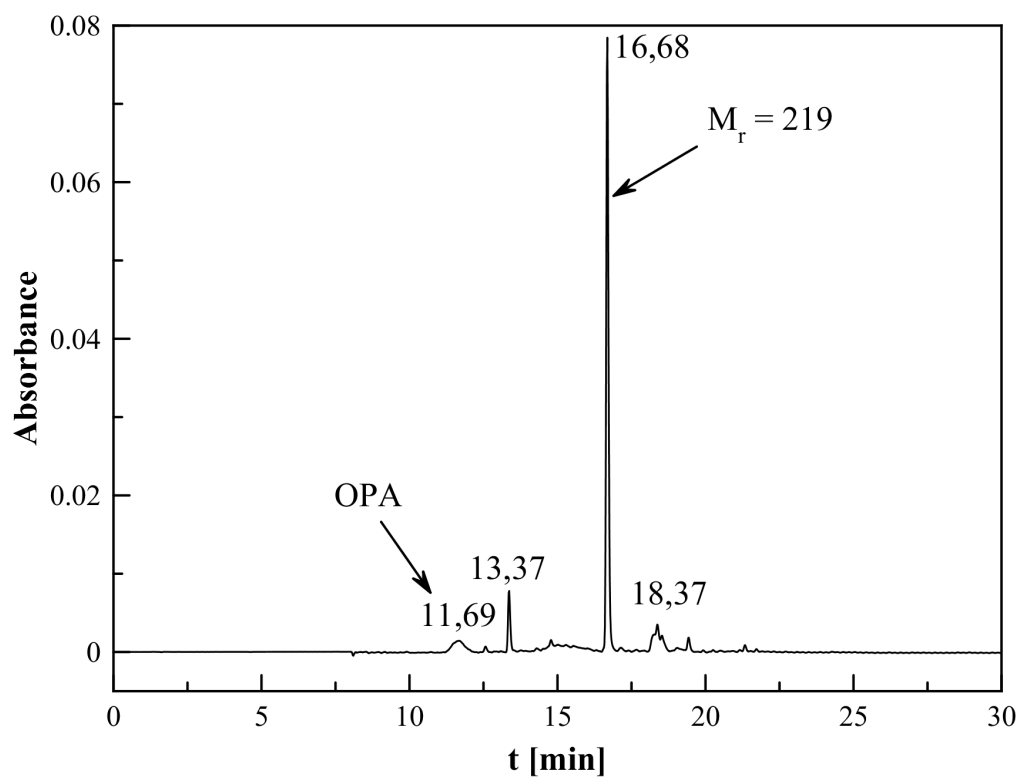


Obr. 4.7. Schéma fragmentace protonovaného 2.

Glycin ethyl ester je možno zakoupit pouze ve formě hydrochloridu, takže bylo potřeba nejprve extrahovat samotný glycin ethyl ester. Z chromatogramu reakční směsi glycin ethyl esteru s OPA (viz obr. 4.8.) je patrné, že směs obsahovala kromě produktu 2 eluujícím v čase 16,64 min také mnoho nečistot. Ty mohou pocházet ze samotného roztoku glycin ethyl esteru, jehož extrakce byla úspěšná pouze částečně. To vyplývá z faktu, že i po delší době v roztoku stále zůstával nezreagovaný OPA s retenčním časem 11,57 min i přes to, že reakční směs OPA a roztoku extrahovaného glycin ethyl esteru byla ekvimolární. Přítomnost nečistot může být způsobena také tím, že glycin ethyl ester samotný není příliš stabilní látkou a pravděpodobně se rozkládá. Látky vznikající rozkladem glycin ethyl esteru pak také mohou reagovat s OPA za vzniku neznámých produktů. Pokud byl k reakci použit stabilní glycin ethyl ester hydrochlorid (viz obr. 4.9.), nečistot v reakční směsi bylo mnohem méně. Na druhou stranu ale přítomnost hydrochloridu snížila pH reakční směsi, což mělo za následek zpomalení průběhu reakce - OPA nemůže reagovat protonizovanou aminoskupinou.



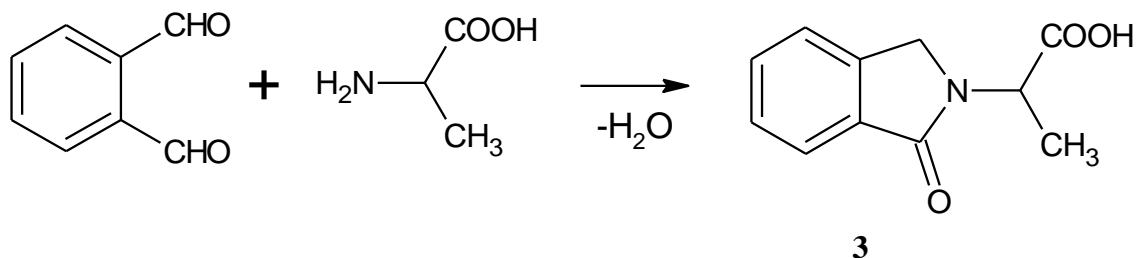
Obr. 4.8. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA a glycin ethyl esteru.



Obr. 4.9. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s glycin ethyl ester hydrochloridem.

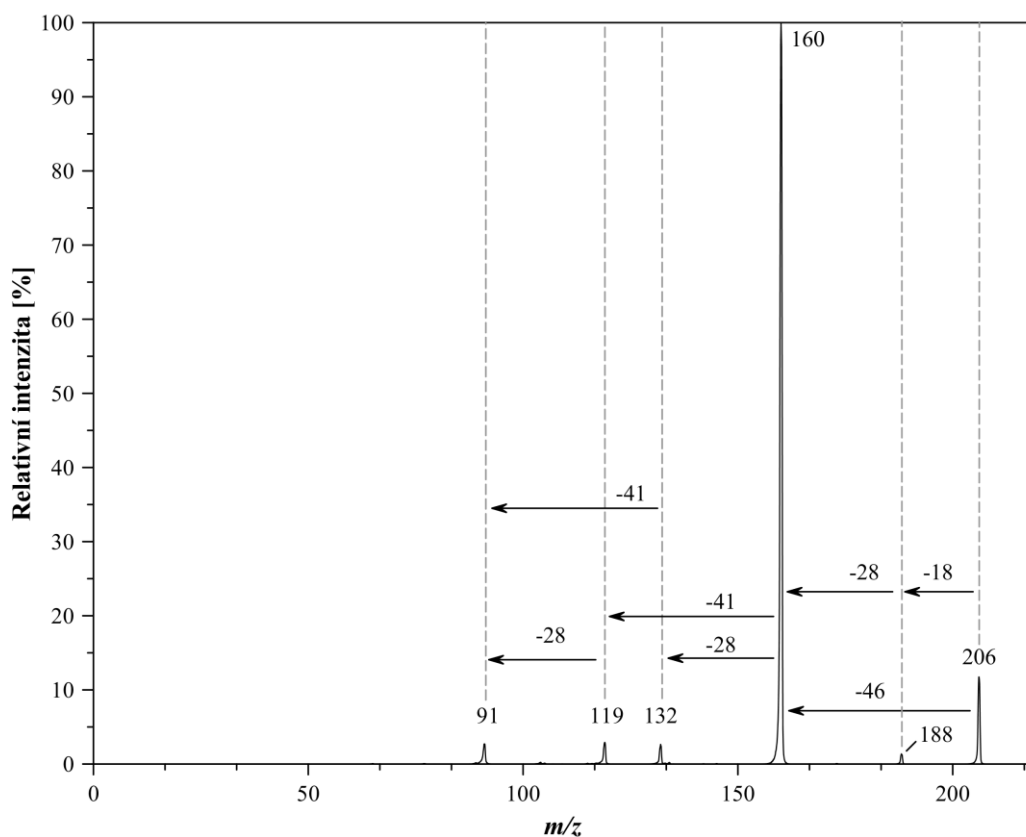
4.3. Reakce OPA s alaninem

Produktem reakce OPA s alaninem je 2-(1-oxo-1*H*-2,3-dihydroisindol-2-yl)propionová kyselina (**3**), která je znázorněna na obr. 4.10. V literatuře byly popsány antibakteriální účinky této látky podobné účinkům β -laktámových antibiotik. [29]



Obr. 4.10. Reakce OPA s alaninem.

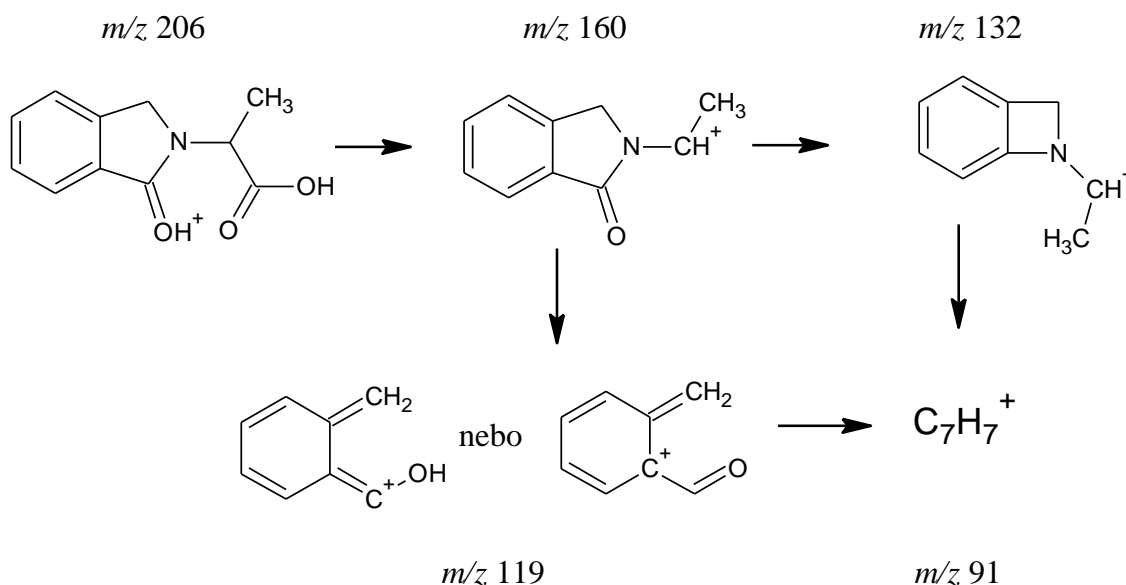
Produkt reakce má relativní molekulovou hmotnost 205, v CID spektru na obr. 4.11. tedy pozorujeme protonovanou molekulu s m/z 206.



Obr. 4.11. CID spektrum protonované molekuly **3**.

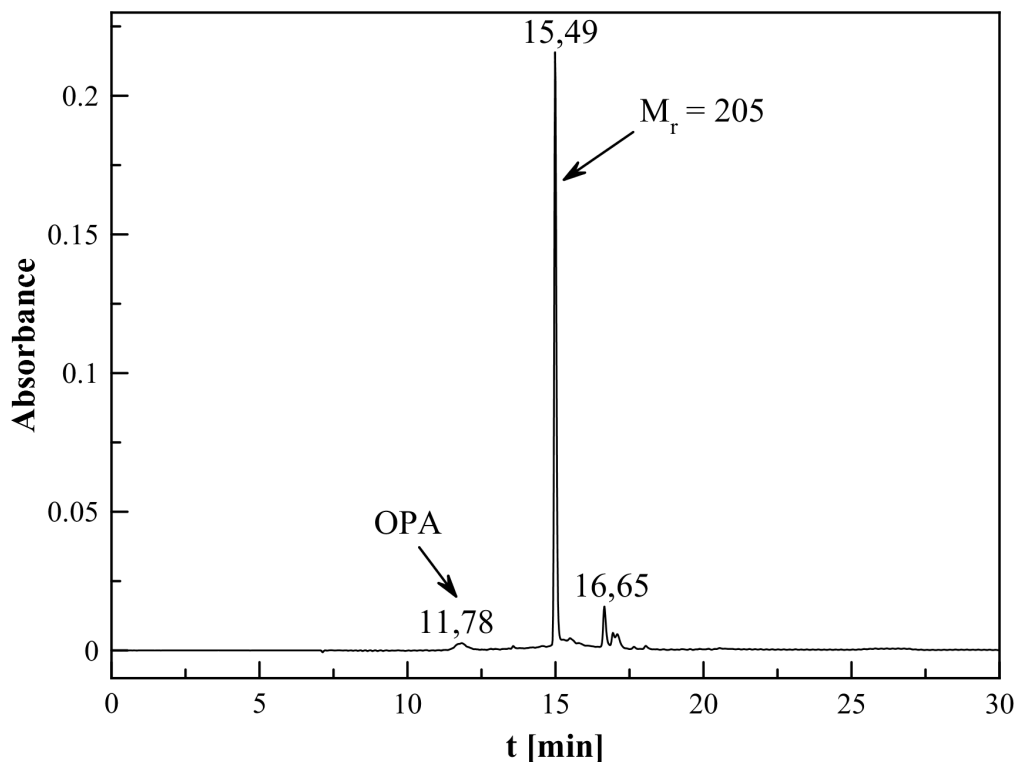
Ion s největší intenzitou je fragment s m/z 160, který vzniká ztrátou kyseliny mravenčí. K té může docházet stejně jako u **1** ve dvou krocích, kdy mateřský ion m/z 206 nejdříve

ztrácí molekulu vody a následně CO, nebo molekulu HCOOH. Další postup fragmentace je taktéž analogický předchozím sloučeninám. Ion m/z 160 pak může dále fragmentovat na ion s m/z 132 za ztráty CO, nebo ion s m/z 119 za ztráty acetonitrilu. Fragment m/z 132 se stejně jako fragment m/z 119 v iontovém zdroji také může rozpadat na směs tropyliu a benzyliu. I v tomto případě je získané CID spektrum v souladu s navrženou strukturou produktu. Schéma fragmentace je naznačeno v obrázku 4.12.



Obr. 4.12. Schéma fragmentace protonované molekuly **3**.

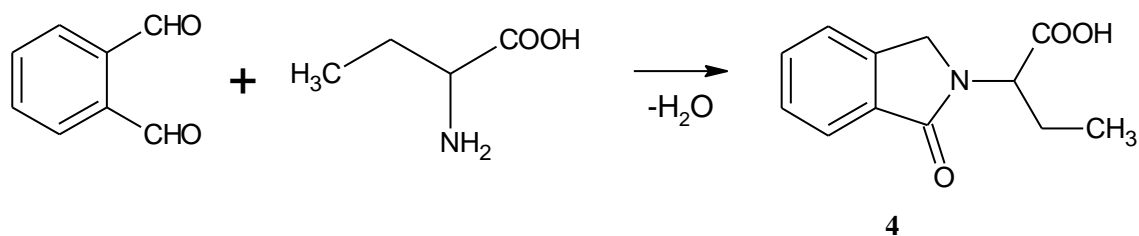
3 je jediným produktem reakce OPA s alaninem. Vyplývá to tak mimo jiné i z analýzy reakční směsi HPLC (chromatogram viz obr. 4.13.). Nejintenzivnějším píkem chromatogramu je pík produktu **3** s retenčním časem 15,49 min. V čase 11,78 je možno stále pozorovat nezreagovaný OPA. Pík v čase 16,65 je s největší pravděpodobností nečistota pocházející z reakční směsi nebo z chromatografické aparatury.



Obr. 4.13. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s alaninem.

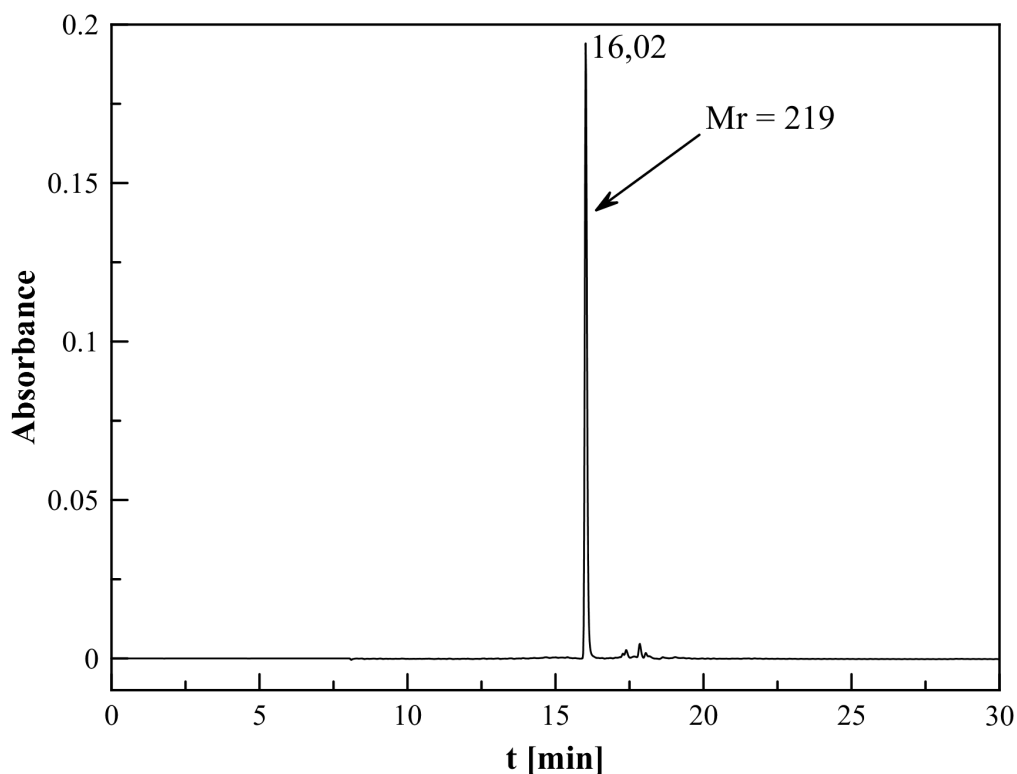
4.4. Reakce OPA s α -aminomáselnou kyselinou

Reakcí OPA s α -aminomáselnou kyselinou vzniká 2-(1-oxo-1*H*-2,3-dihydroisoindol-2-yl)butanová kyselina (**4**). **4** má relativní molekulovou hmotnost 219 a její struktura je znázorněna na obrázku 4.14.



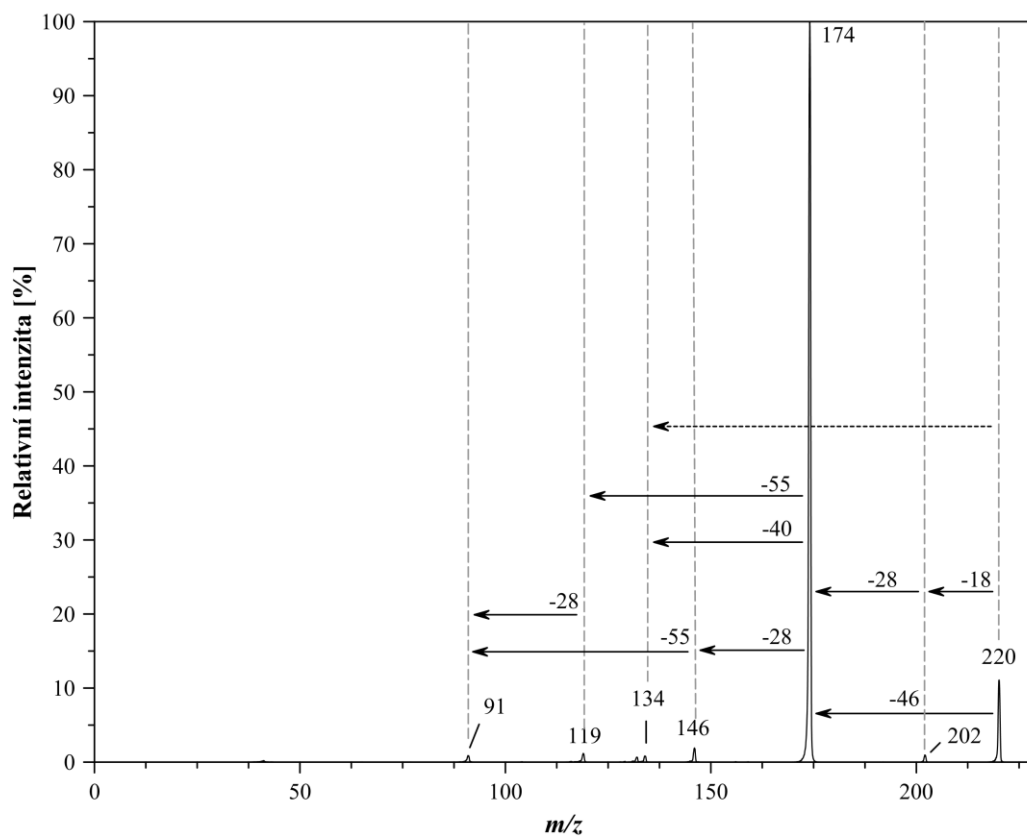
Obr. 4.14. Reakce OPA s α -aminomáselnou kyselinou.

4 vytvořila ve vodném roztoku reakční směsi krystaly, které byly izolovány a analyzovány. Z chromatogramu viz obr. 4.15.) roztoku rozpuštěných krystalů je zřejmé, že **4** je jediným produktem reakce OPA s α -aminomáselnou kyselinou s retenčním časem 16,02 min. Menší píky eluující mezi 17. a 18. minutou jsou neidentifikované nečistoty.

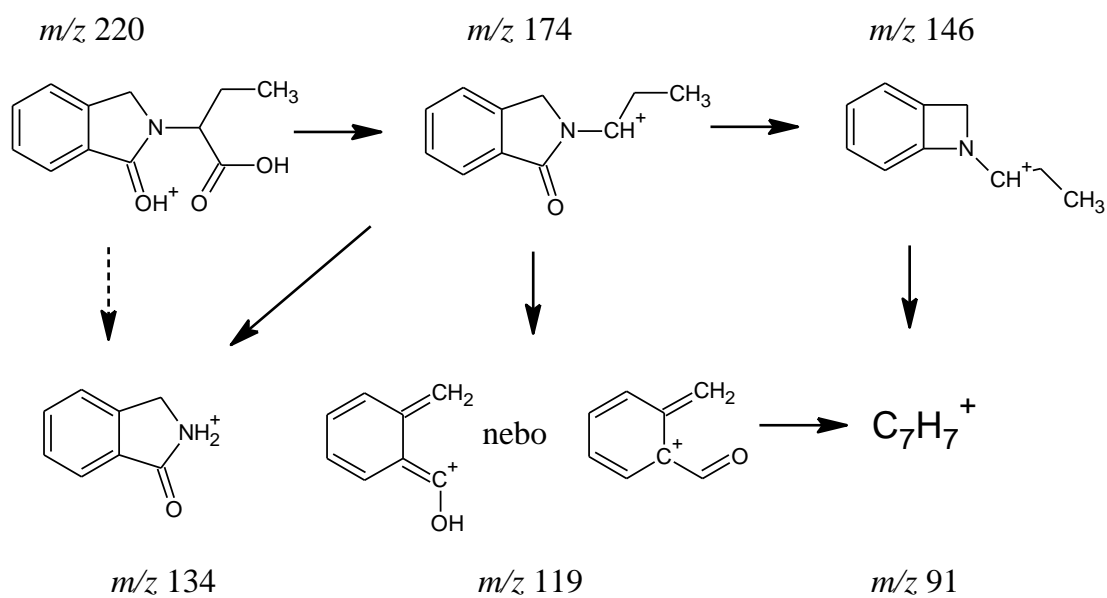


Obr. 4.15. Chromatogram (RP) vodného roztoku sloučeniny **4**.

Dále bylo zaznamenáno CID spektrum produktu reakce OPA s α -aminomáselnou kyselinou (viz obr. 4.16.). Stejně jako u ostatních jednoduchých aminokyselin, i v případě **4** dochází ke ztrátě molekuly mravenčí kyseliny buď v jednom kroku nebo ve dvou za vzniku fragmentu s m/z 174. Fragment m/z 174 je nejintenzivnějším píkem spektra a dále se rozpadá za ztráty ethylenu na fragment m/z 146. Dále z něj vznikají také fragmenty m/z 134 a m/z 119. Ion m/z 146 může také fragmentovat za vzniku m/z 119 a stejně tak ion m/z 134. Schéma fragmentace je znázorněno na obr. 4.17.



Obr. 4.16. CID spektrum protonované molekuly 4.



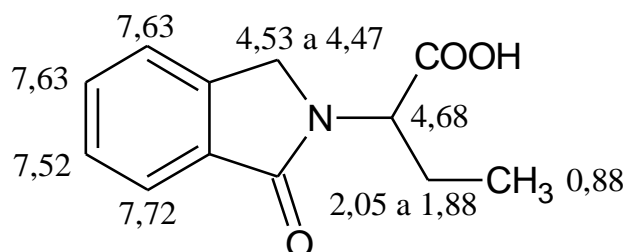
Obr. 4.17. Schéma fragmentace protonované molekuly 4.

Jelikož se podařilo produkt získat v pevném skupenství, bylo možné provést analýzu EI MS. Fragmentace molekulárního iontu v tomto spektru je podobná fragmentaci v ESI, pouze vlivem dodání větší energie vzniká více fragmentů.

EI MS (m/z (intenzita)): 219 (M^+ , 24%), 174 (100%), 160 (7%), 146 (11%), 132 (9%), 91 (12%), 90 (10%), 89 (8%), 59 (5%)

Nakonec byla provedena také analýza NMR, která potvrdila, že produktem reakce skutečně **4**. Přiřazením viz obr. 4.18.

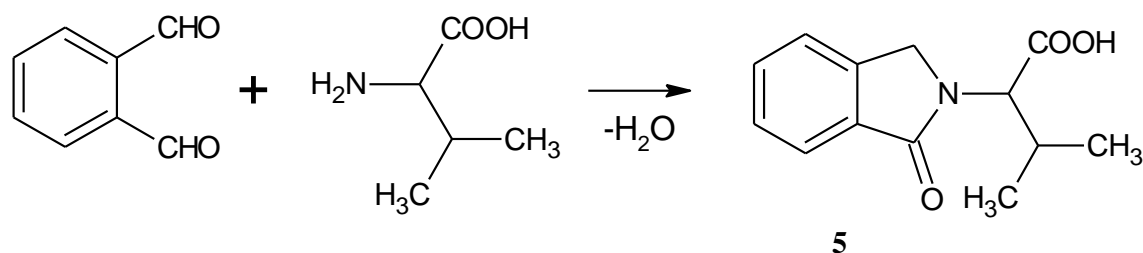
^1H NMR: 0,88 (t, $J = 14,99$ Hz, 3H); 1,88 (m, 2H); 2,05 (m, 2H); 4,47 (d, $J = 17,33$ Hz, 2H); 4,53 (d, $J = 17,36$ Hz, 2H); 4,68 (q, $J = 15,78$ Hz, 1H); 7,52 (m, 1H); 7,63 (d, $J = 0,84$ Hz, 1H), 7,72 (d, $J = 7,45$ Hz, 1H)



Obr. 4.18. Přiřazení signálů látky **4** v jejím ^1H NMR spektru.

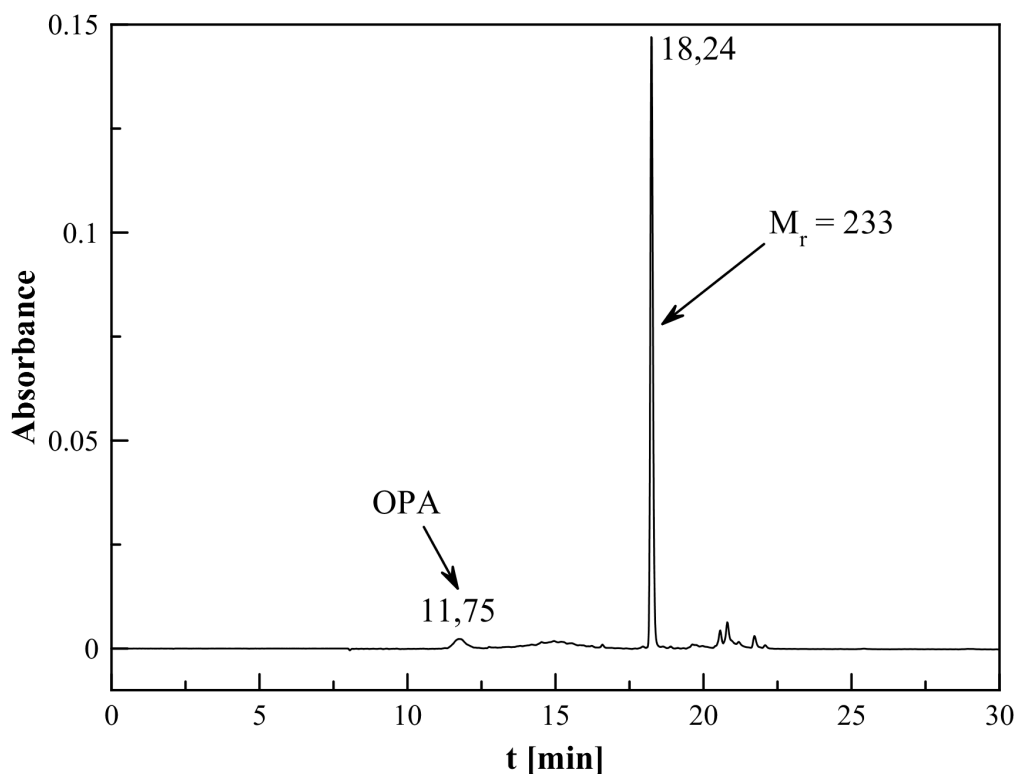
4.5. Reakce OPA s valinem

OPA reaguje s valinem za vzniku 2S-3-methyl-2-(1-oxo-1*H*-2,3-dihydroisoindol-2-yl)butanové kyseliny (**5**) s relativní molekulovou hmotností 233. Struktura viz obrázky 4.19. Stejně jako produkt reakce OPA s alaninem má i **5** antibakteriální účinky. [29]



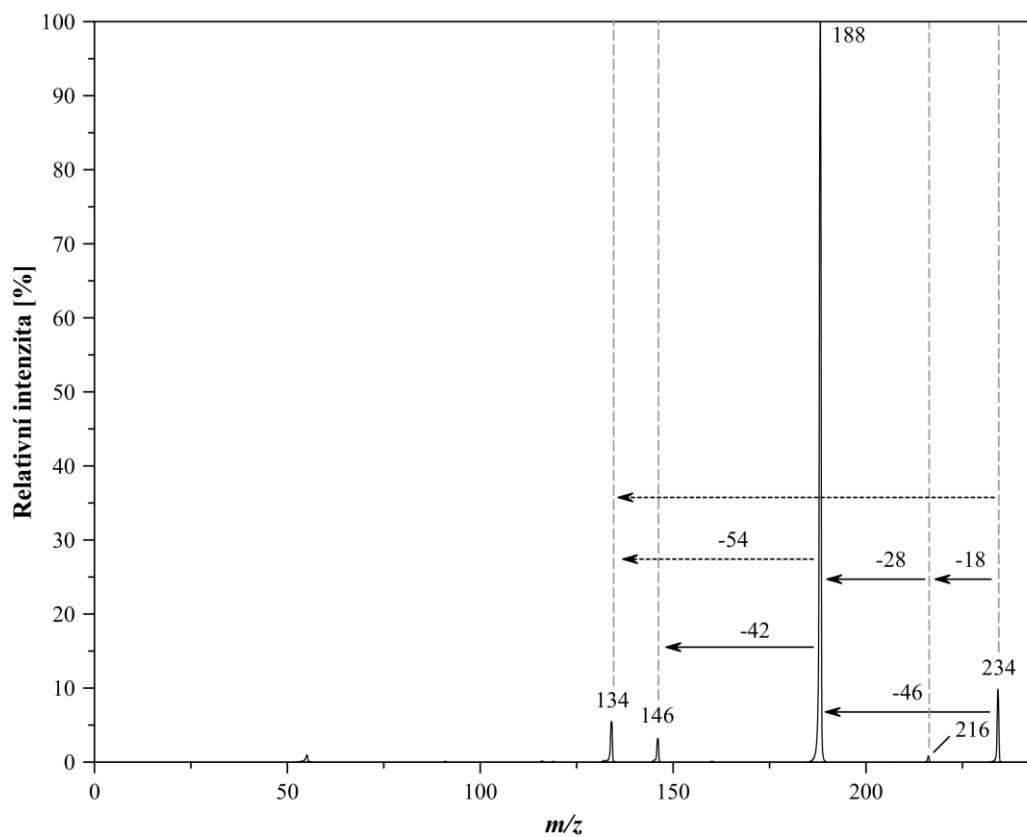
Obr. 4.19. Reakce OPA s valinem.

Z chromatogramu (viz obr. 4.20.) je zřejmé, že reakcí vzniká pouze jeden produkt s retenčním časem 18,24 min. V čase 11,75 je stále vidět OPA, jelikož nebylo možné použít chromatogram čistého produktu. Z důvodu výměny mobilních fází je v něm pík produktu výrazně posunut. Píky objevující se za 20. minutou jsou pravděpodobně nečistoty pocházející z reakční směsi, popř. se jedná o zbytky z předchozích měření pocházející z chromatografu.

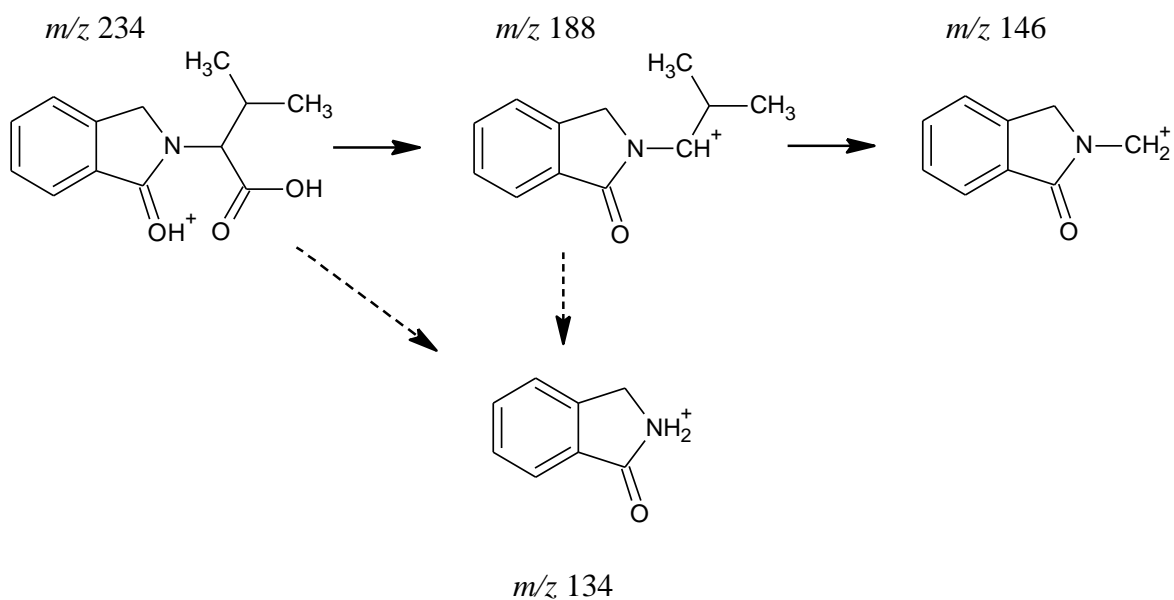


Obr. 4.20. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s valinem.

Dále byla zaznamenána CID spektra. Protonovanou molekulou **5** (viz obr. 4.21.) je ion m/z 234. I v tomto případě je fragmentace analogická předchozím látkám. Nejintenzivnějším píkem je ion m/z 188. Ten vzniká ztrátou mravenčí kyseliny z protonované molekuly m/z 234. I zde dochází k eliminaci HCOOH dvěma různými způsoby: buď se z mateřského iontu nejdříve odštěpuje molekula vody za vzniku fragmentu s m/z 216 a následně CO , nebo se může odštěpovat celá molekula mravenčí kyseliny najednou. Je pravděpodobné, že z fragmentu m/z 234 vzniká také ion m/z 134. Fragment m/z 188 se dále rozpadá za vzniku iontů m/z 146 a pravděpodobně i m/z 134. Fragmentace iontu m/z 188 na ion m/z 134 by ale vyžadovala isomeraci v isobutylové části molekuly. Schéma fragmentace viz obr. 4.22.



Obr. 4.21. CID spektrum protonované molekuly 5.



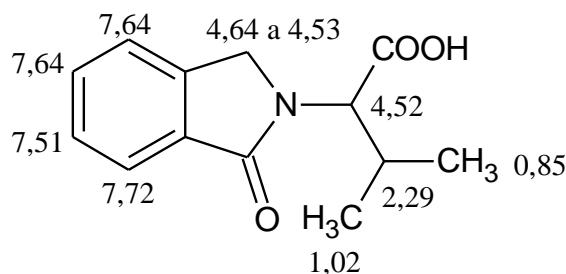
Obr. 4.22. Schéma fragmentace protonované molekuly 5.

5 byla úspěšně izolována ve formě krystalů, které byly podrobeny analýze EI MS.

EI MS (m/z (intenzita)): 233 (M^+ , 60%), 188 (100%), 174 (25%), 146 (25%), 134 (30%), 91 (13%), 90 (18%), 89 (14%), 77 (6%), 55 (11%).

EI MS spektrum má bohatší fragmentaci, než CID spektrum pořízené ESI MS. Obě spektra nejsou v rozporu s navrženou strukturou. I přes to byla provedena analýza NMR, která potvrdila, že produktem reakce OPA s valinem je opravdu **5**. Přiřazení signálů ve vodíkovém NMR spektru **5** viz obr. 4.23.

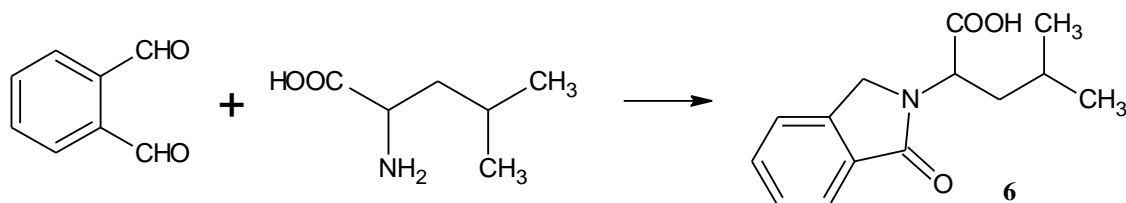
¹H NMR: 0,85 (d, $J = 6,72$ Hz, 3H); 1,02 (d, $J = 6,67$ Hz, 3H); 2,29 (m, 1H); 4,52 (d, $J = 9,40$ Hz, 1H); 4,53 (d, $J = 10,15$ Hz, 2H); 4,64 (d, $J = 17,66$ Hz, 2H); 7,51 (m, 1H); 7,64 (d, $J = 4,40$ Hz, 1H); 7,72 (d, $J = 7,78$ Hz, 1H)



Obr. 4.23. Přiřazení signálů látky **5** v jejím ¹H NMR spektru.

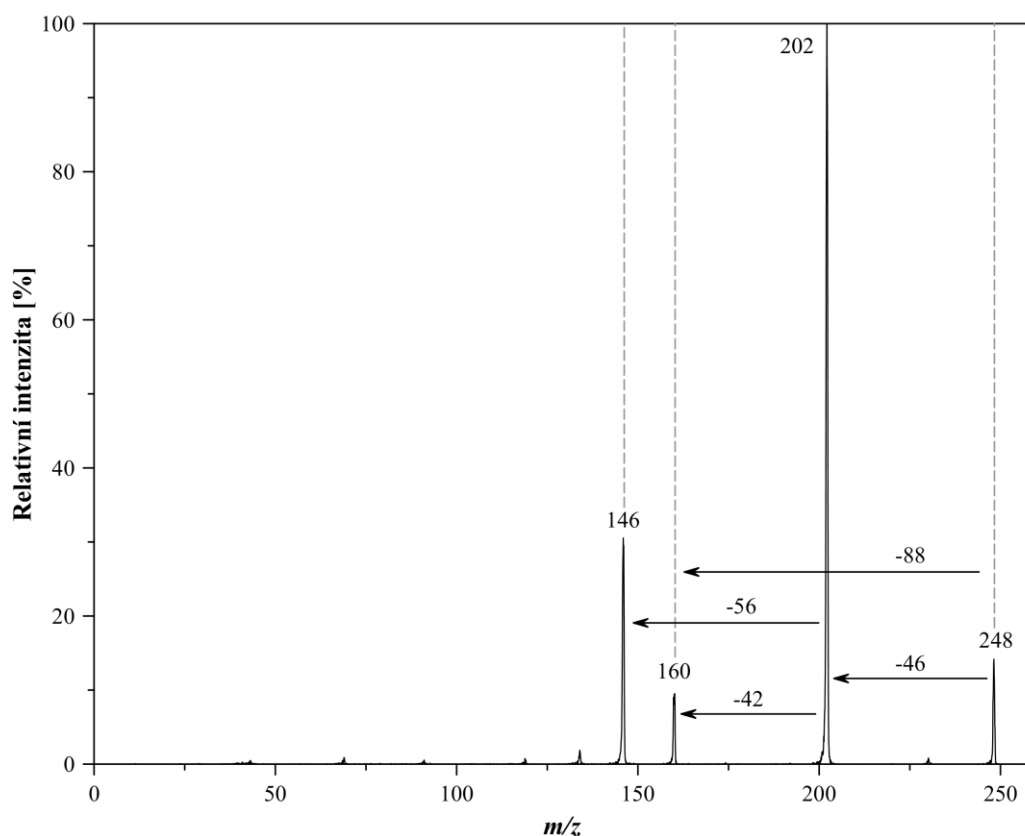
4.6. Reakce OPA s leucinem

Produktem reakce OPA s leucinem je 2S-4-methyl-2-(1-oxo-1*H*-2,3-dihydroisoindol-2-yl)pentanová kyselina (**6**). Produkt má relativní molekulovou hmotnost 247 a jeho struktura je navržena na obr. 4.24.

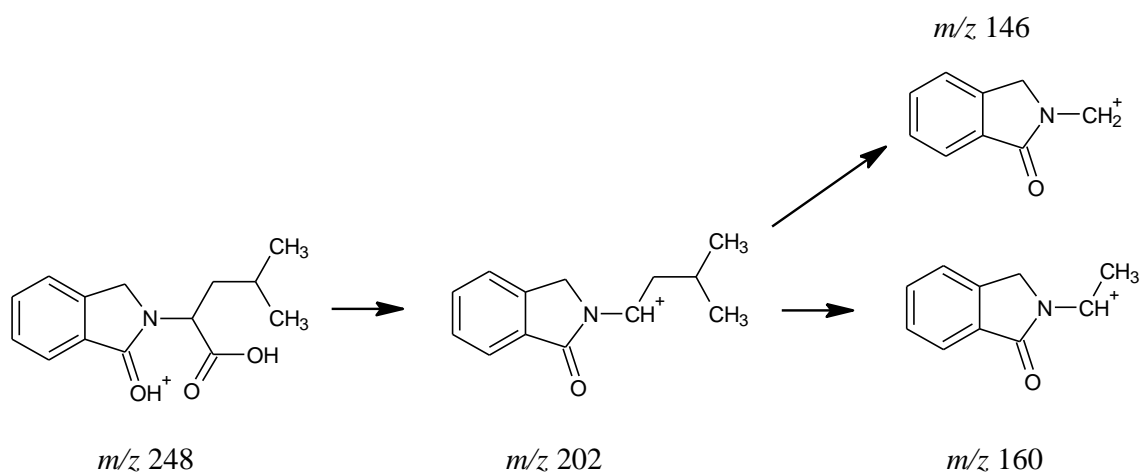


Obr. 4.24. Reakce OPA s leucinem.

V CID spektru **6** (viz obr. 4.25.) je nejvýraznějším fragmentem ion m/z 202. Ten vzniká z protonované molekuly m/z 248. I zde dochází k migraci náboje z karbonylové skupiny isoindolové struktury na atom kyslíku v karboxylu za současného odštěpení molekuly kyseliny mravenčí. Fragment m/z 202 může dále ztrácet propen za vzniku fragmentu m/z 160, nebo isobuten za vzniku fragmentu m/z 146. Schéma fragmentace je na obr. 4.26.



Obr. 4.25. CID spektrum protonované molekuly 6.



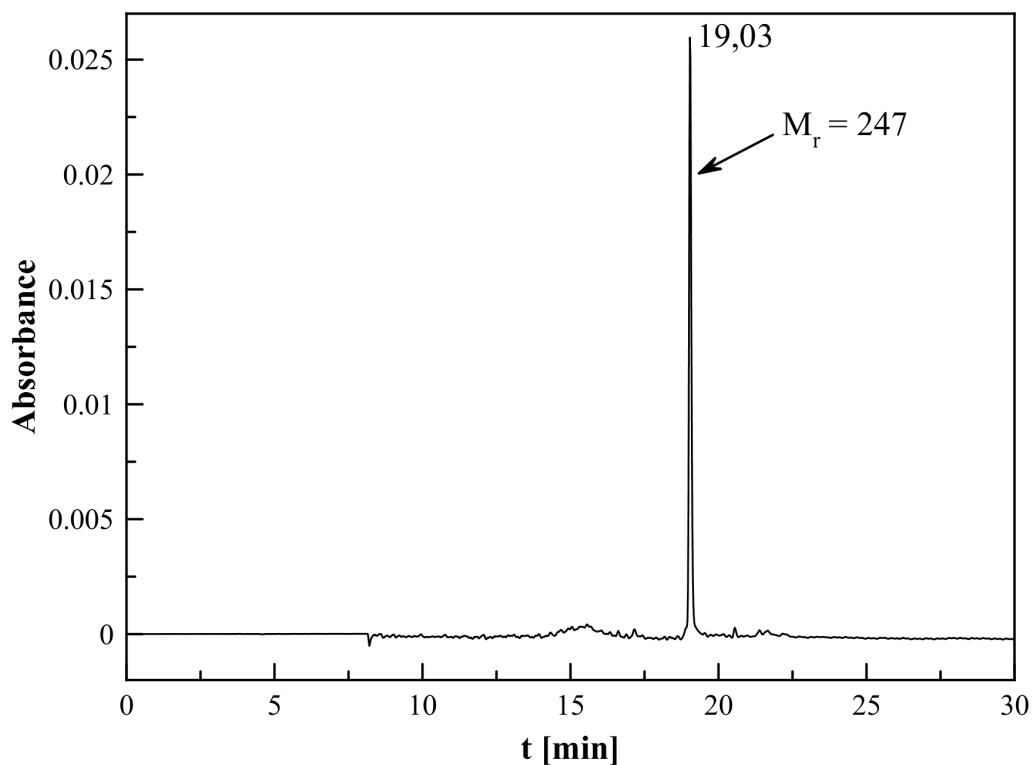
Obr. 4.26. Schéma fragmentace protonované molekuly 6.

Jelikož se podařilo **6** získat z roztoku ve formě krystalů, mohlo být změřeno její spektrum EI MS.

EI MS (m/z (intenzita)): 247 (M^+ , 10%), 202 (100%), 191 (23%), 173 (19%), 160 (83%), 146 (39%), 134 (12%), 133 (7%), 132 (11%), 118 (9%), 91 (13%), 90 (13%), 89 (9,81%), 77 (5%)

Čistota krystalů byla prověřena HPLC analýzou (chromatogram viz obr. 4.27.).

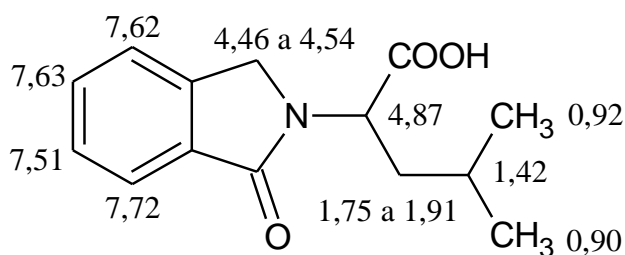
V chromatogramu se nachází pouze jeden pík s retenčním časem 19,03 min, který patří **6**.



Obr. 4.27. Chromatogram (RP) čistého produktu **6**.

Dále bylo definitivně potvrzeno, že produkt reakce OPA s leucinem je **6** ověřením struktury NMR analýzou. Přiřazení signálů v ^1H NMR spektru viz obr. 4.28.

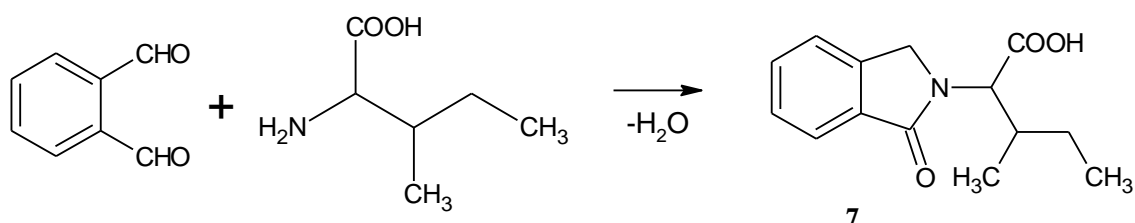
^1H NMR: 0,90 (d, $J = 6,44$ Hz, 3H); 0,92 (d, $J = 6,71$ Hz, 3H); 1,42 (m, 1H); 1,75 (m, 2H); 1,91 (m, 2H); 4,87 (dd, $J = 4,08$; 4,66 Hz, 1H); 4,46 (d, $J = 17,48$ Hz, 2H); 4,54 (d, $J = 18,06$ Hz, 2H); 7,51 (m, 1H); 7,62 (d, $J = 1,04$ Hz, 1H); 7,63 (d, $J = 1,18$ Hz, 1H); 7,72 (d, $J = 7,62$ Hz, 1H)



Obr. 4.28. Přiřazení signálů látky **6** v jejím ^1H NMR spektru.

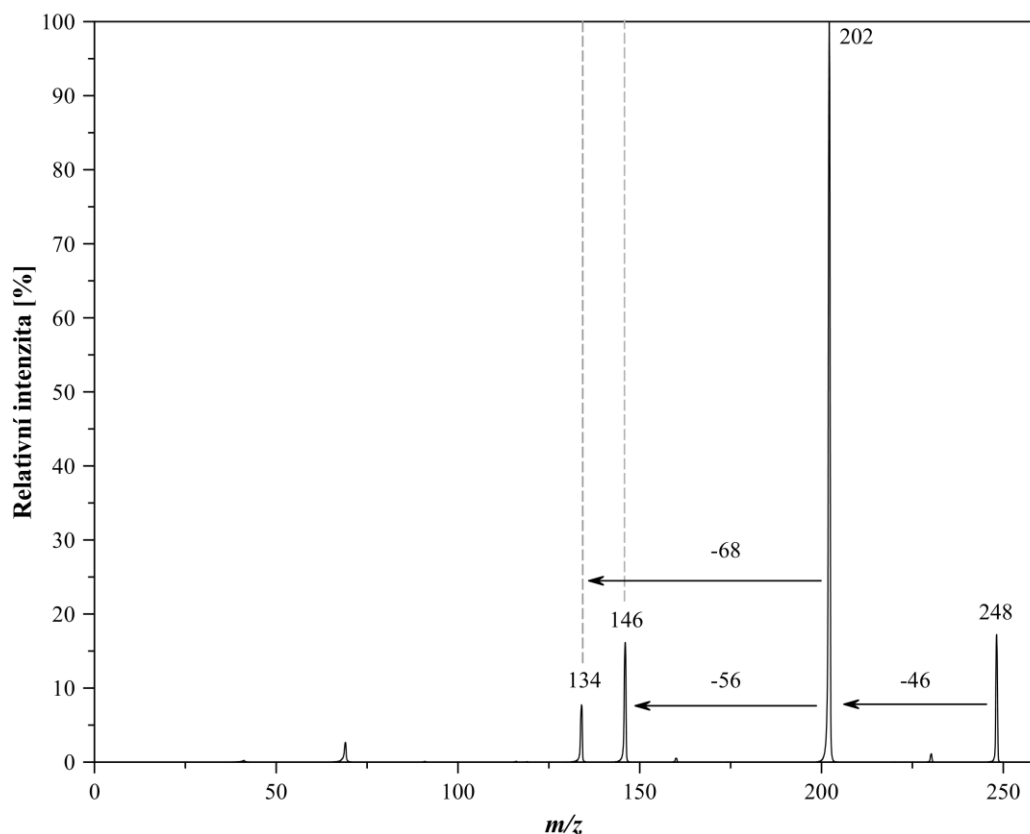
4.7. Reakce OPA s isoleucinem

Reakcí OPA s isoleucinem vzniká isomer produktu reakce OPA s Leu 2S-3-methyl-2-(1-oxo-1*H*-2,3-dihydroisoindol-2-yl)pentanová kyselina (**7**). Od **6** se liší pouze pozicí methylu na řetězci pentanové kyseliny. Relativní molekulová hmotnost 247. Schéma reakce je znázorněno na obr. 4.29. I tato sloučenina byla již syntetizována a byly popsány její antibakteriální účinky na gram negativní a gram pozitivní bakterie. [29]

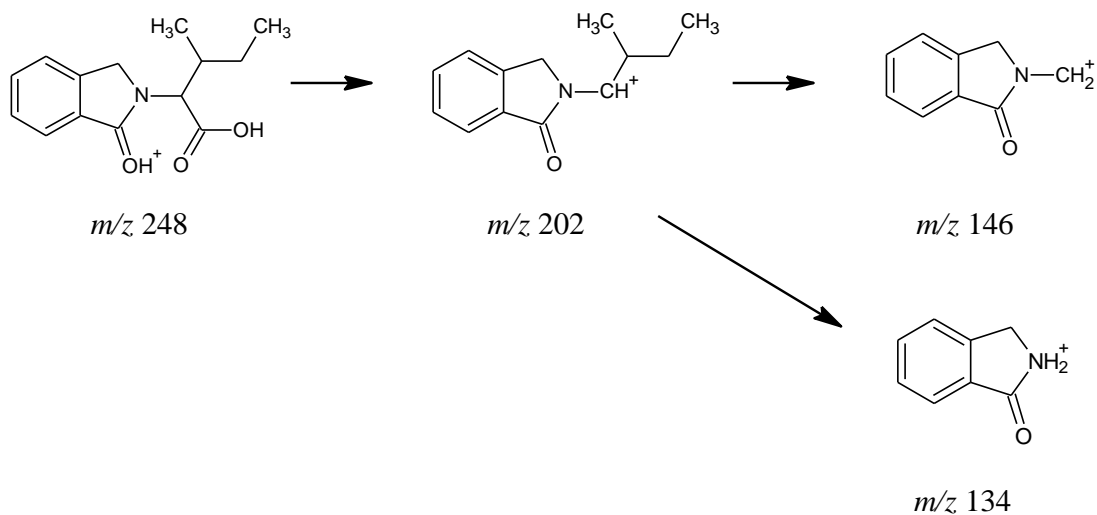


Obr. 4.29. Reakce OPA s isoleucinem.

CID spektrum (viz obr. 4.30.) produktu reakce OPA s isoleucinem je v souladu s navrženou strukturou. Nejintenzivnější pík patří fragmentu m/z 202, stejně jako u **6**. Při jeho vzniku dochází stejně jako v předchozím případě ke ztrátě mravenčí kyseliny z protonované molekuly m/z 248. Fragment m/z 202 pak za ztráty butenu tvoří ion m/z 146, nebo ion m/z 134. Na rozdíl od CID spektra látky **6** se ve spektru látky **7** nevyskytuje ion m/z 160. Tento fragment totiž vzniká ztrátou molekuly propenu, která se ale z navržené struktury **7** odštěpovat nemůže. Schéma fragmentace viz obr. 4.31.



Obr. 4.30. CID spektrum protonované molekuly 7.



Obr. 4.31. Schéma fragmentace protonované molekuly 7.

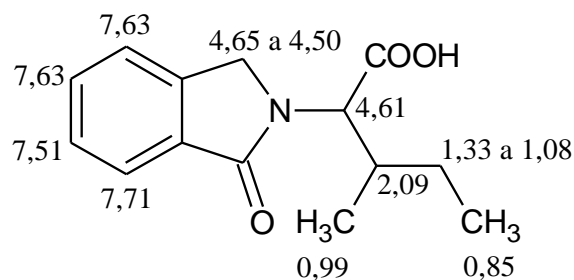
Produkt tvoří ve vodném roztoku krystaly, které byly z roztoku izolovány a použity k EI MS a NMR analýzám. Fragmentace v EI spektru je bohatší, nicméně i zde je fragmentace v souladu s navrženou strukturou produktu.

EI MS (m/z (intenzita)): 247 (M^+ , 38%), 202 (89%), 190 (100%), 174 (42%), 173 (44%), 146 (46%), 134 (53%), 118 (24%), 91 (17%), 90 (22%), 89 (16%), 77 (7%)

NMR analýzou bylo definitivně potvrzeno, že produktem reakce OPA s isoleucinem

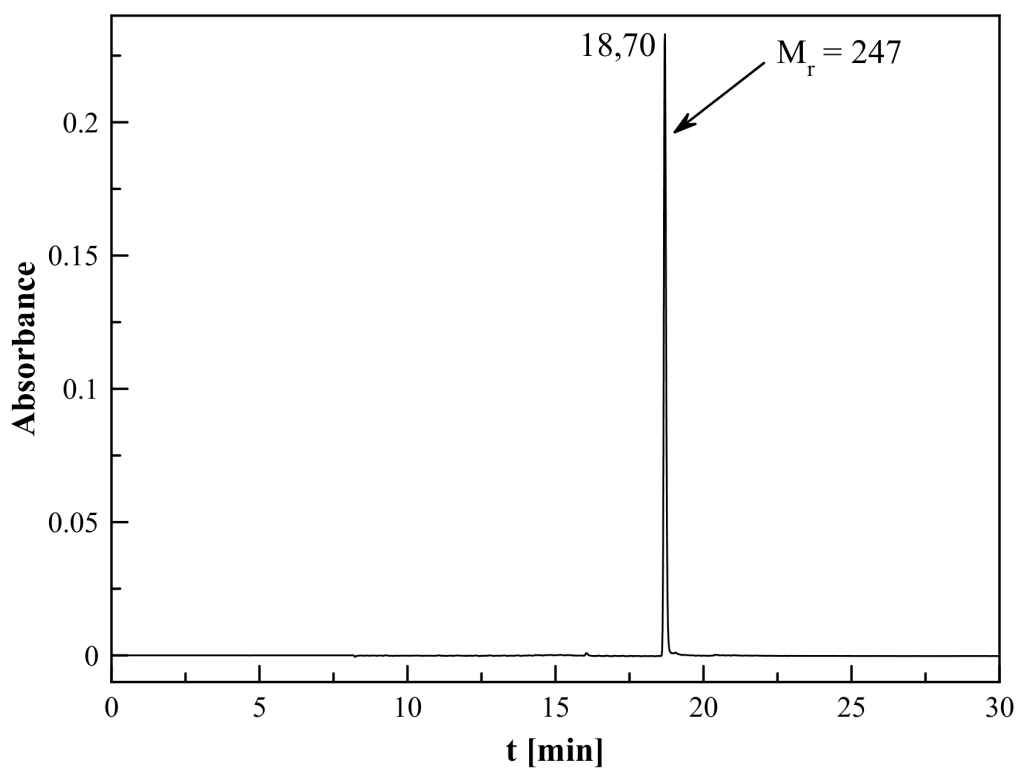
je opravdu **7**. Přiřazení ^1H NMR signálů **7** je uvedeno na obr. 4.32.

^1H NMR: 0,85 (t, $J = 15,05$ Hz, 3H); 0,99 (t, $J = 15,05$ Hz, 3H); 1,08 (m, 2H); 1,33 (m, 2H); 2,09 (m, 2H); 4,50 (d, $J = 17,56$ Hz, 2H); 4,61 (d, $J = 9,96$ Hz, 1H); 4,65 (d, $J = 17,56$ Hz, 2H); 7,51 (m, 1H); 7,63 (d, $J = 4,23$ Hz, 1H); 7,71 (d, $J = 7,61$ Hz, 1H)



Obr. 4.32. Přiřazení signálů látky **7** v jejím ^1H NMR spektru.

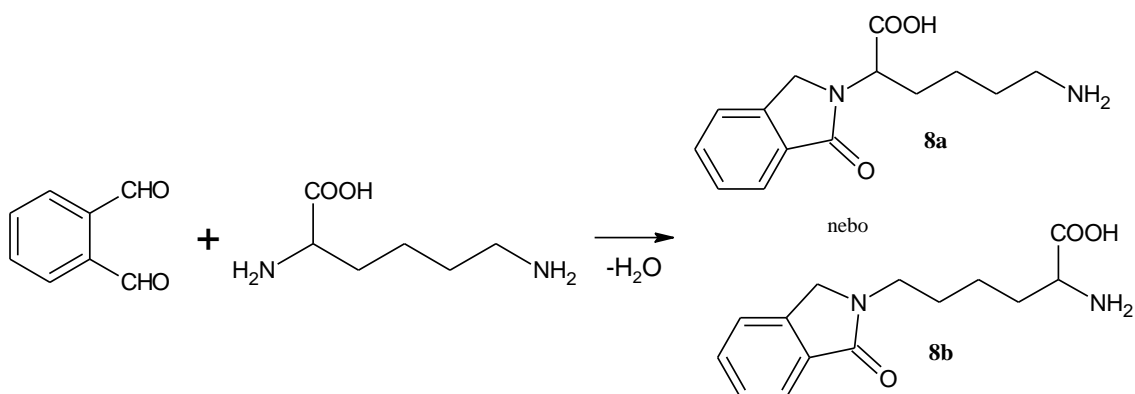
Na závěr byla ověřena čistota krystalů HPLC analýzou (chromatogram viz obr. 4.33.). V chromatogramu je jediný pík s retenčním časem 18,70 min patřící **7**.



Obr. 4.33. Chromatogram (RP) roztoku čisté **7**.

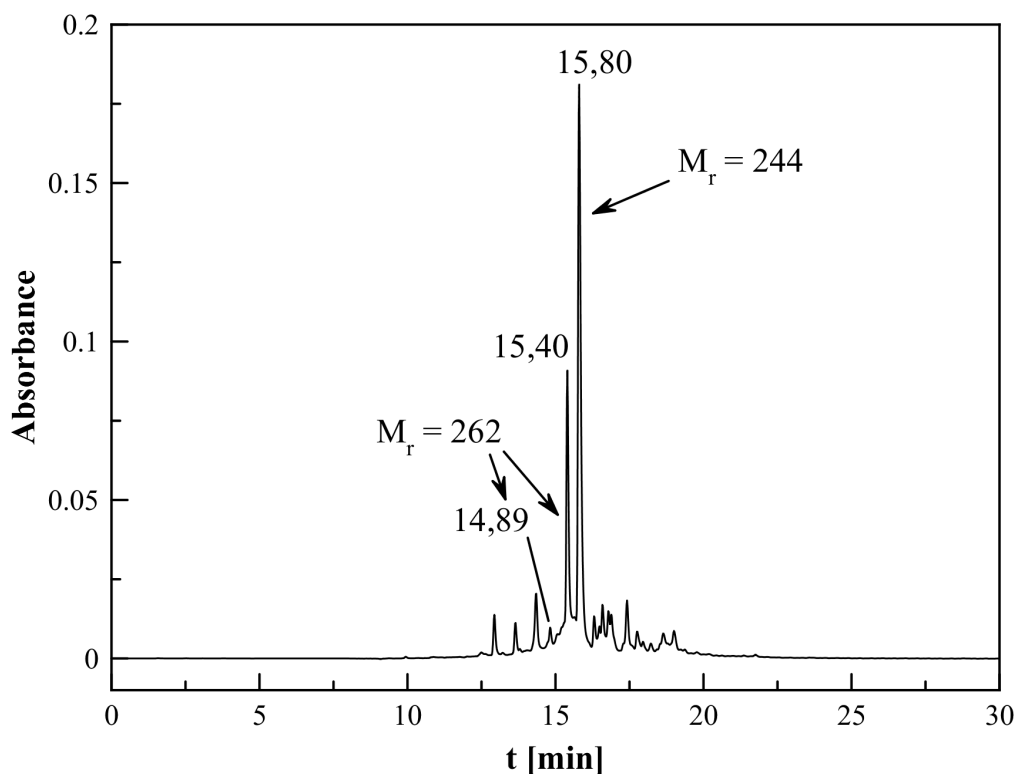
4.8. Reakce OPA s lysinem

Na základě produktů předchozích reakcí byly očekávanými produkty reakce OPA s lysinem isomery 6-amino-2-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)hexanová kyselina (**8a**) a 2-amino-6-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)hexanová kyselina (**8b**) s relativní molekulovou hmotností 262. Produkt **8a** vzniká reakcí α -aminoskupiny lysinu s molekulou OPA a produkt **8b** reakcí aminoskupiny v postranním řetězci s molekulou OPA. Předpokládané reakční schéma je znázorněno na obr. 4.34.



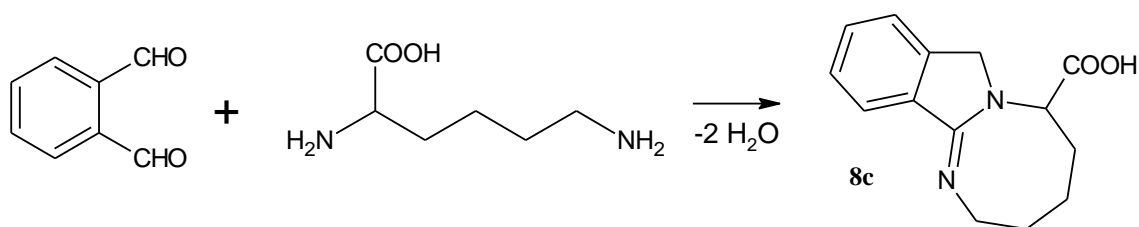
Obr. 4.34. Reakce OPA s lysinem.

Analýzou HPLC bylo ale zjištěno, že hlavním produktem reakce není ani **8a**, ani **8b**, nýbrž produkt s relativní molekulovou hmotností 244, který se ukrývá v nejintenzivnějším píku spektra s retenčním časem 15,80 min. Očekávaným produktům **8a** a **8b** patří píky s retenčními časy 14,89 min a 15,40 min. Z chromatogramu na obr. 4.35. je patrné, že reakční směs obsahovala mnoho dalších složek, které se nepodařilo identifikovat.



Obr. 4.35. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s lysinem.

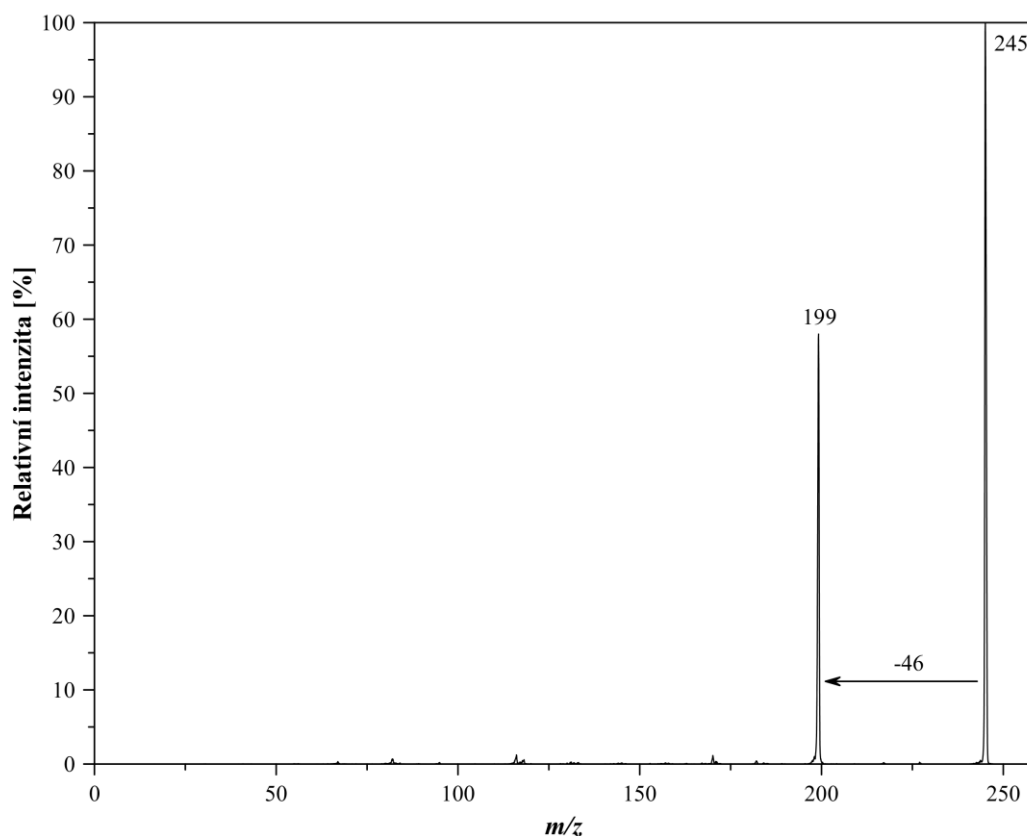
Následně byla navržena nejpravděpodobnější struktura produktu reakce, která je znázorněna na obr. 4.36. Jedná se o tricyklickou strukturu se systematickým názvem (1Z)-2,3,4,5,6,8-hexahydro[1,3]diazocino[2,1-a]isoindol-6-karboxylová kyselina (**8c**) a relativní molekulovou hmotností 244.



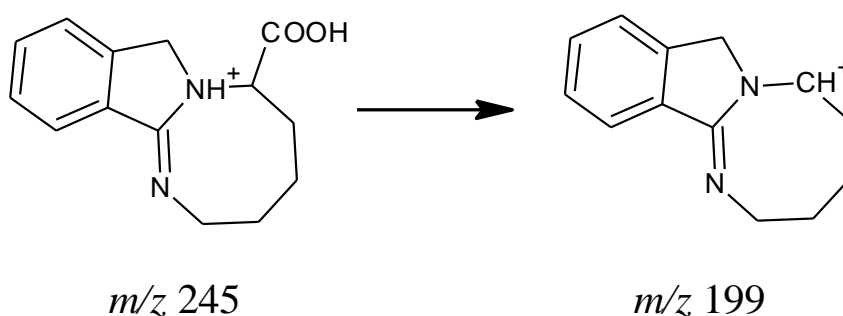
Obr. 4.36. Schéma vzniku hlavního produktu reakce OPA s lysinem.

Reakční roztok byl odpařen, čímž byla získána relativně čistá látka **8c** ve formě oranžovohnědého prášku. Bylo změřeno CID spektrum produktu (viz obr. 4.37.), které koresponduje s navrženou strukturou. Z protonované molekuly s m/z 245 se totiž ztrácí pouze molekula kyseliny mravenčí. Vzniklý fragment m/z 199 dále téměř nefragmentuje ani při kolizní energii 20 V. To znamená, že jeho struktura je velmi stabilní, což

je v souladu s představou, že se může jednat o zbylý tricyklický heterocyklus po odštěpení HCOOH. Schéma fragmentace viz obr. 4.38.



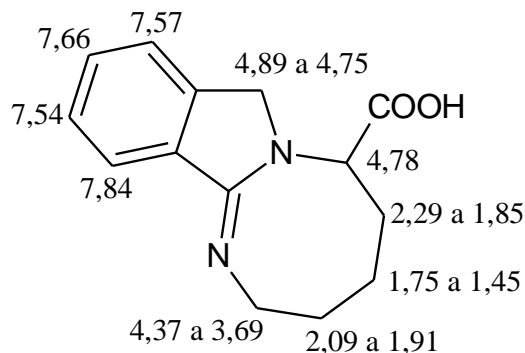
Obr. 4.37. CID spektrum protonované molekuly **8c**.



Obr. 4.38. Schéma fragmentace protonované molekuly **8c**.

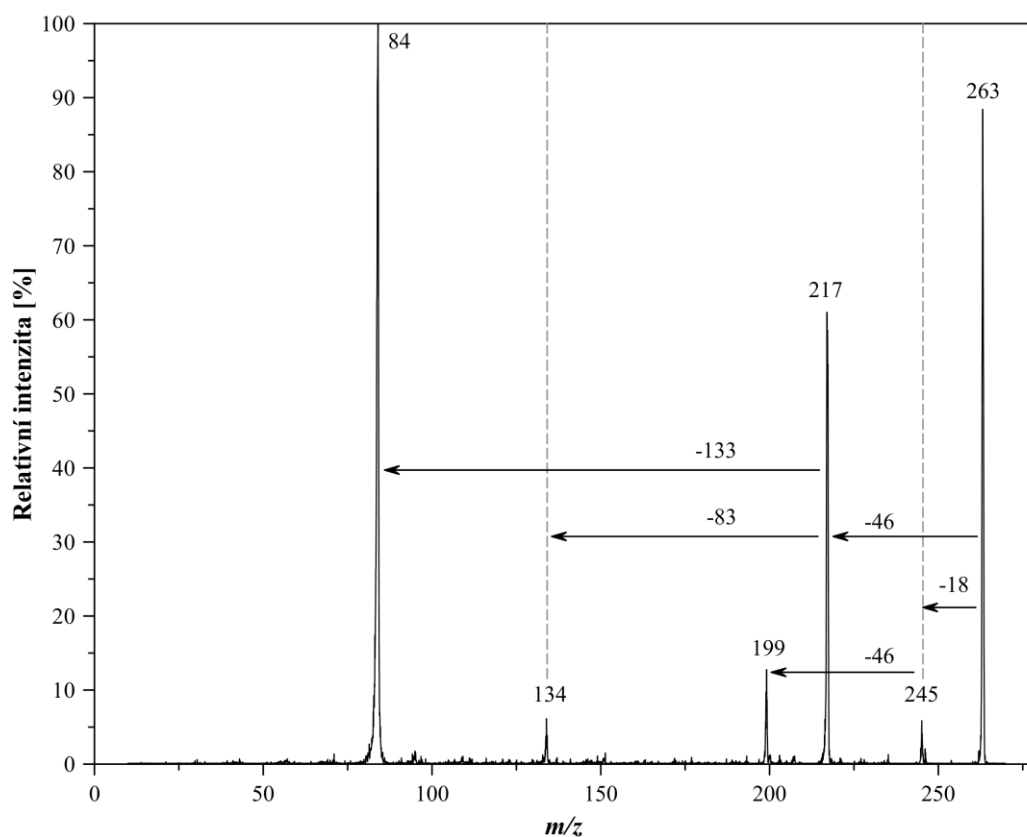
Pevný vzorek byl také použit k EI MS analýze. Při pokusu o získání EI spektra ale docházelo v sondě přímého vstupu k dekarboxylaci, takže nebylo možno spektrum zaznamenat. Dále byla také provedena analýza NMR, která potvrdila navrženou strukturu tohoto produktu. Přiřazení ^1H NMR signálů **8c** viz obr. 4.39.

¹H NMR: 1,45 (m, 2H); 1,75 (dt, $J = 6,89; 8,42$ Hz, 2H); 1,85 (m, 2H); 1,91 (t, $J = 26,03$ Hz, 2H); 2,09 (m, 2H); 2,29 (m, 2H); 3,69 (m, 2H); 4,37 (m, 2H); 4,75 (d, $J = 18,58$ Hz, 2H); 4,78 (t, $J = 11,67$ Hz, 1H); 4,89 (d, $J = 19,45$ Hz, 2H); 7,54 (t, $J = 15,12$ Hz, 1H); 7,57 (d, $J = 8,17$ Hz, 1H); 7,66 (t, $J = 15,12$ Hz, 1H); 7,84 (d, $J = 7,98$ Hz, 1H)



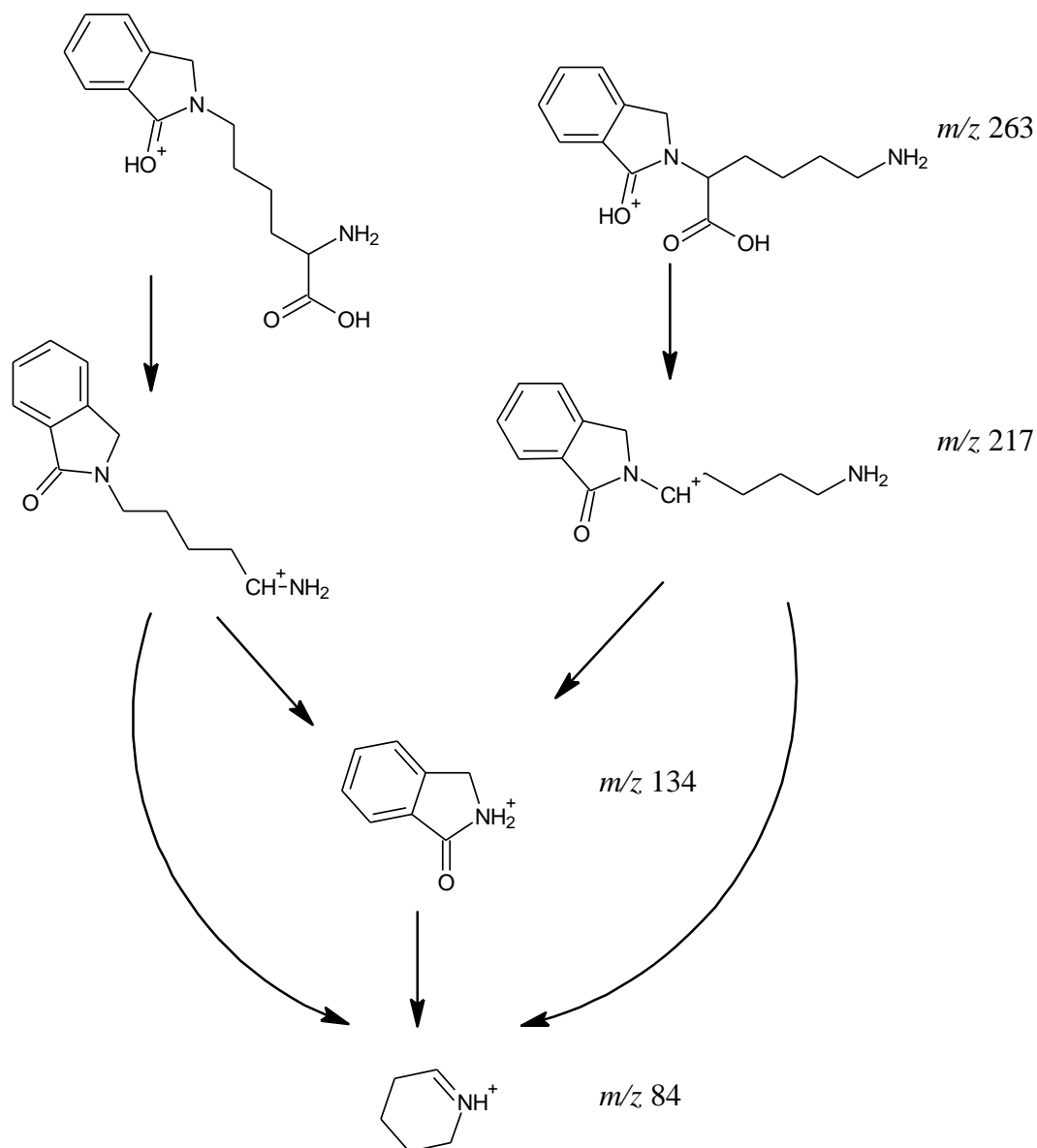
Obr. 4.39. Přiřazení signálů látky **8c** v jejím ¹H NMR spektru.

V případě CID spektra (viz obr. 4.40.) látek **8a** a **8b** fragmentace také odpovídá navrženým strukturám. Spektra jsou bohatší na fragmenty, což naznačuje, že tyto produkty jsou méně stabilní.



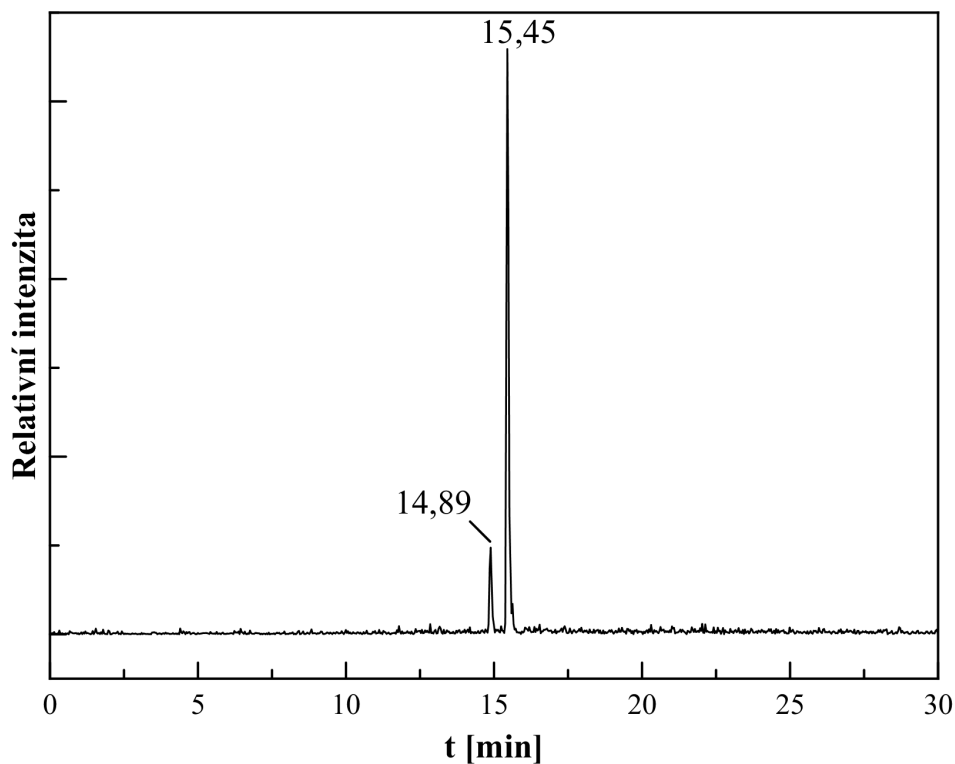
Obr. 4.40. CID spektrum směsi protonovaných produktů **8a** a **8b**.

Protonovaná molekula m/z 263 může při fragmentaci v menší míře ztrácet molekulu vody, což vede ke vzniku fragmentu m/z 245 pravděpodobně se strukturou **8c**. Tak pak tvoří fragment m/z 199 (viz obr. 4.37. a 4.38). Ion m/z 263 také ve větší míře ztrácí kyselinu mravenčí za vzniku fragmentu m/z 217. Ten se dále štěpí za vzniku fragmentů m/z 134 a m/z 84. Schéma fragmentace viz obr. 4.41.



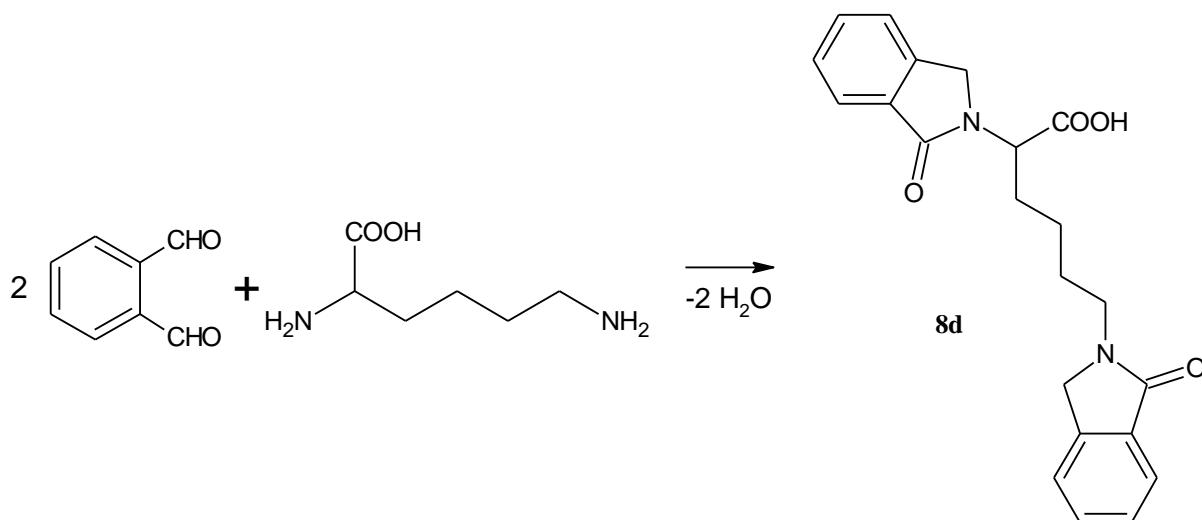
Obr. 4.41. Schéma fragmentace směsi protonovaných molekul **8a** a **8b**.

Je možné, že se jedná pouze o meziprodukty reakce. Tento typ produktu nebylo možné izolovat. Na základě samotných hmotnostních spekter tedy nemůžeme určit, která ze dvou navržených struktur vzniká ve větší míře. Ze záznamu iontového proudu iontu m/z 263 získaného z HPLC (viz obr. 4.42.) je ale jasné, že vznikají oba izomery v poměru 1:6,8.



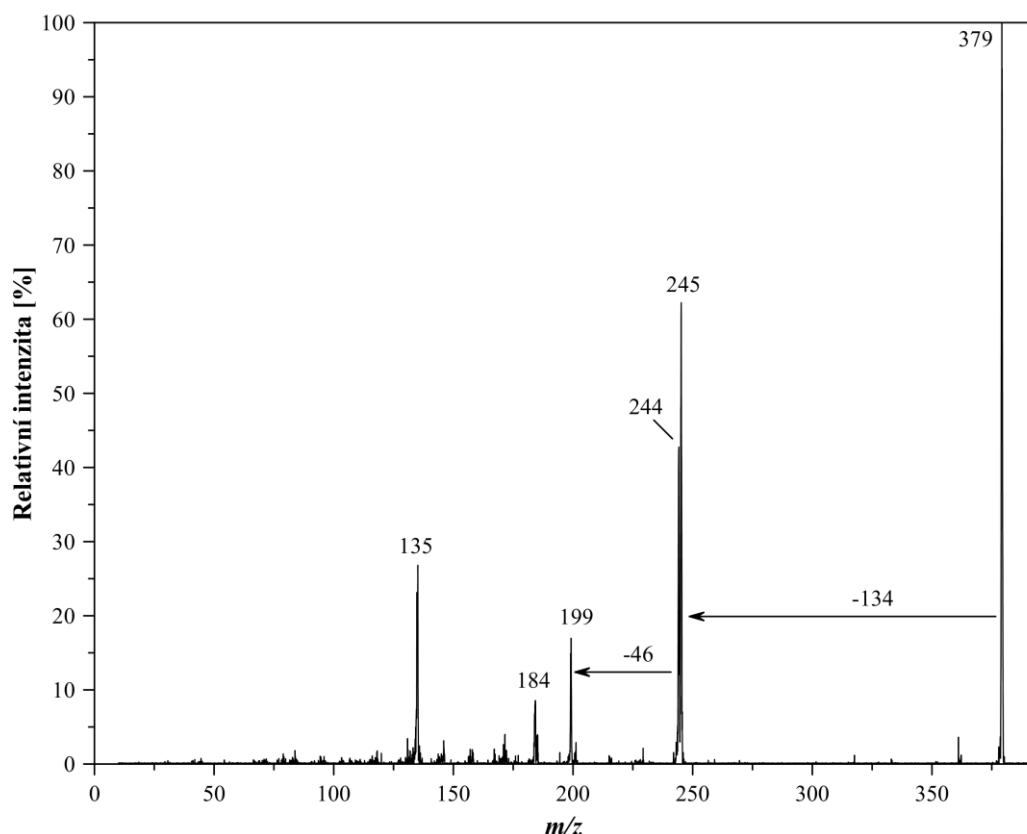
Obr. 4.42. Záznam iontového proudu iontu m/z 263 získaného z HPLC.

V případě reakcí OPA s lysinem je také možná reakce, při které obě aminoskupiny lysinu reagují každá s jinou molekulou OPA. Takový produkt má pak relativní molekulovou hmotnost 378 (**8d**) a jeho možná struktura je uvedena na obr. 4.43.

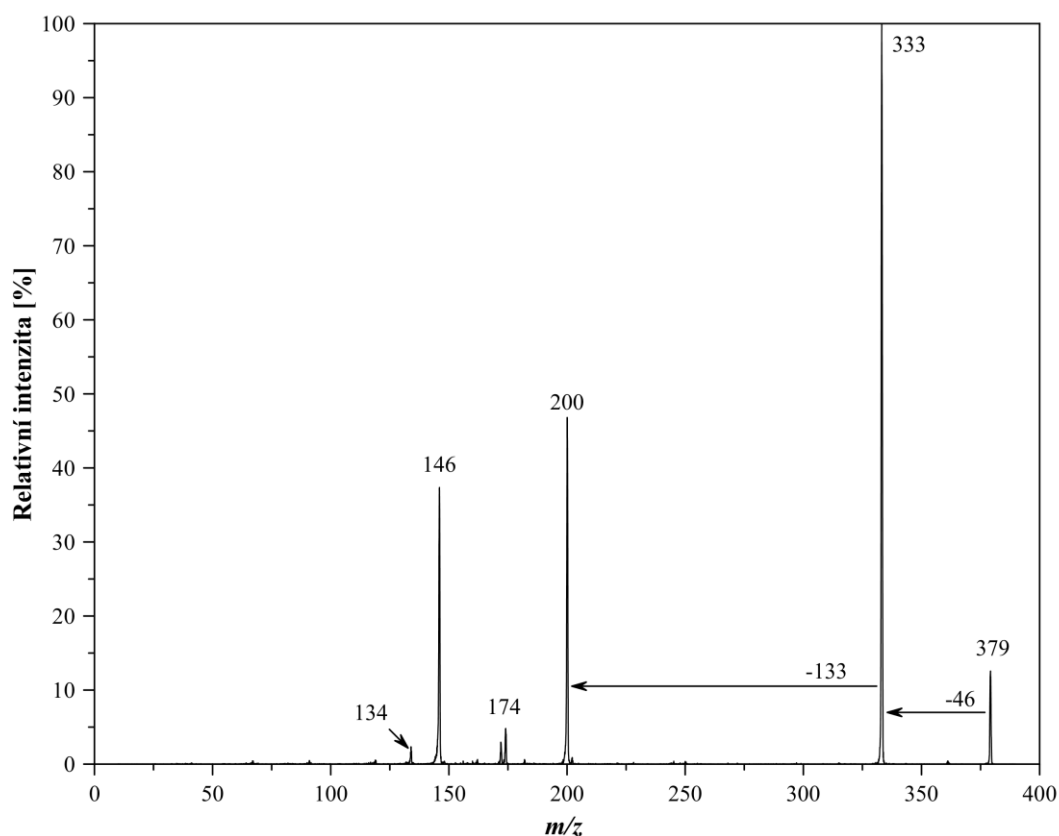


Obr. 4.43. Reakce OPA s lysinem za vzniku produktu **8d**.

Bylo změřeno CID spektrum produktu (viz obr. 4.44.a), který formálně odpovídá reakci dvou molekul OPA s jednou molekulou lysinu. Spektrum bylo srovnáno se CID spektrem standardu (4.44.b). Z těchto CID spekter je zřejmé, že se nejedná o jednu a tu samou látku. Protonovaná molekula m/z 379 standardu tvoří fragment m/z 333, který je nejintenzivnějším píkem spektra. Fragment m/z 333 se pak dále rozpadá na ion m/z 200, který dále fragmentuje za vzniku iontů m/z 174, m/z 146 a m/z 134, které lze najít i ve spektrech produktů jednoduchých AAs. Ve spektru mnou připravené látky je nejintenzivnějším iontem protonovaná molekula m/z 379, který ztrácí fragment s hmotností 134, což je relativní molekulová hmotnost OPA. Vzniká tak fragment m/z 245, který stejně jako **8c** ztrácí kyselinu mravenčí za vzniku fragmentu m/z 199. Dalším relativně intenzivním píkem je m/z 135, což může být protonovaná molekula OPA. Je tedy možné, že se jedná pouze o molekulární adukt **8c** s molekulou OPA. Na druhou stranu je nepravděpodobné, že by molekulární adukt byl tak stabilní, že jeho ion byl nejintenzivnějším iontem ve spektru, navíc se ve spektru vyskytuje poměrně intenzivní fragmenty m/z 244 a m/z 184, jejichž přítomnost také vznik aduktu zpochybňuje. Látku nebylo možné reakční směsi izolovat, takže nemohla být provedena strukturní analýza za účelem potvrzení, či vyvrácení navržené struktury.



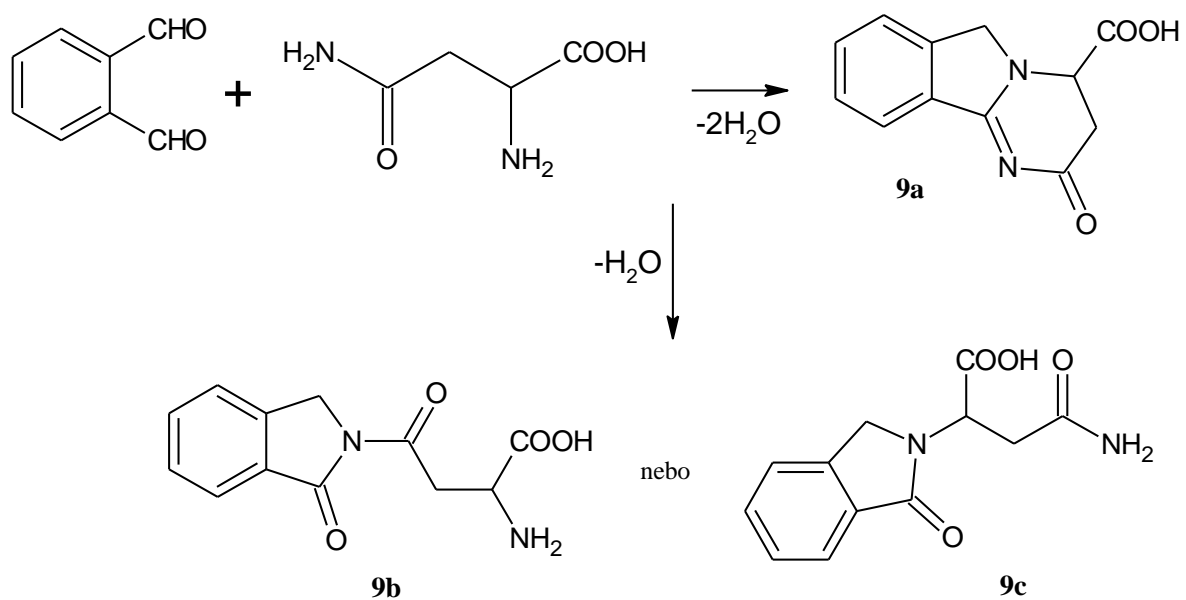
Obr. 4.44.a CID spektrum iontu m/z 379 z reakce OPA s lysinem.



Obr. 4.44.b CID spektrum protonovaného standardu **8d**.

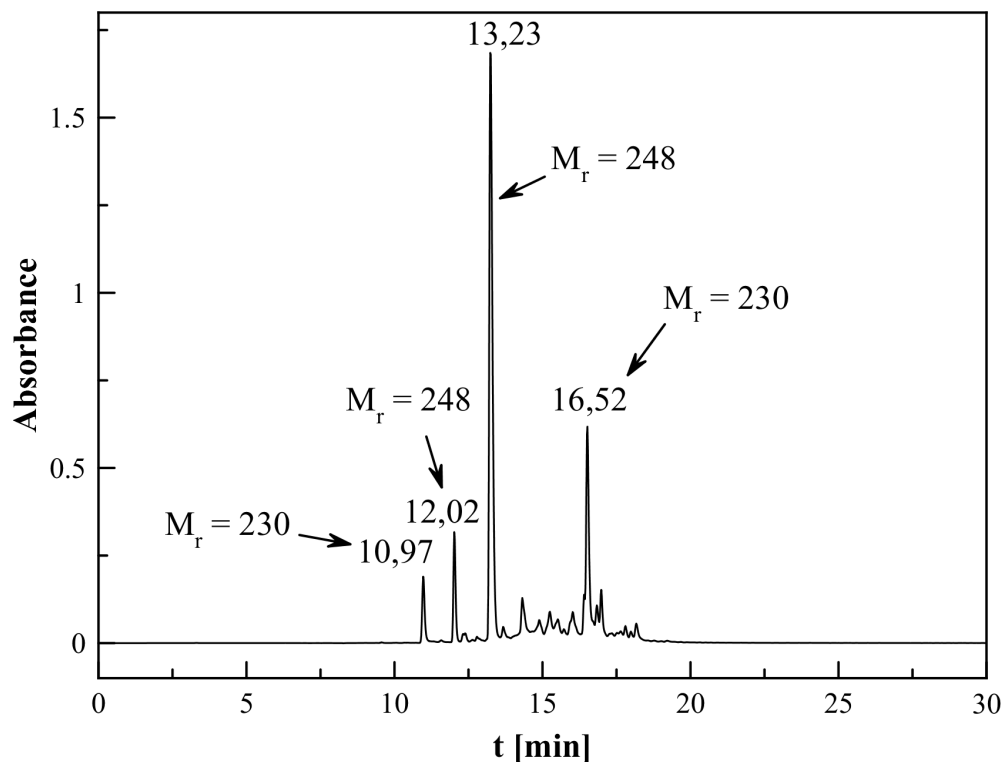
4.9. Reakce OPA s asparaginem

Očekávanými produkty reakce OPA s asparaginem byly látky analogické produktům OPA s lysinem: tricyklický produkt vznikající reakcí α -aminoskupiny i amidové skupiny s jednou molekulou OPA 2-oxo-2,3,4,6-tetrahydropyrimido[2,1-*a*]isoindol-4-karboxylová kyselina (**9a**) s relativní molekulovou hmotností 230 a 2-amino-4-oxo-4-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)butanová kyselina (**9b**) vznikající reakcí amidové skupiny s OPA, resp. 4-amino-4-oxo-2-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)butanová kyselina (**9c**) vznikající reakcí α -aminoskupiny s OPA s relativními molekulovými hmotnostmi 248. (viz obr. 4.45.)



Obr. 4.45. Reakce OPA s asparaginem.

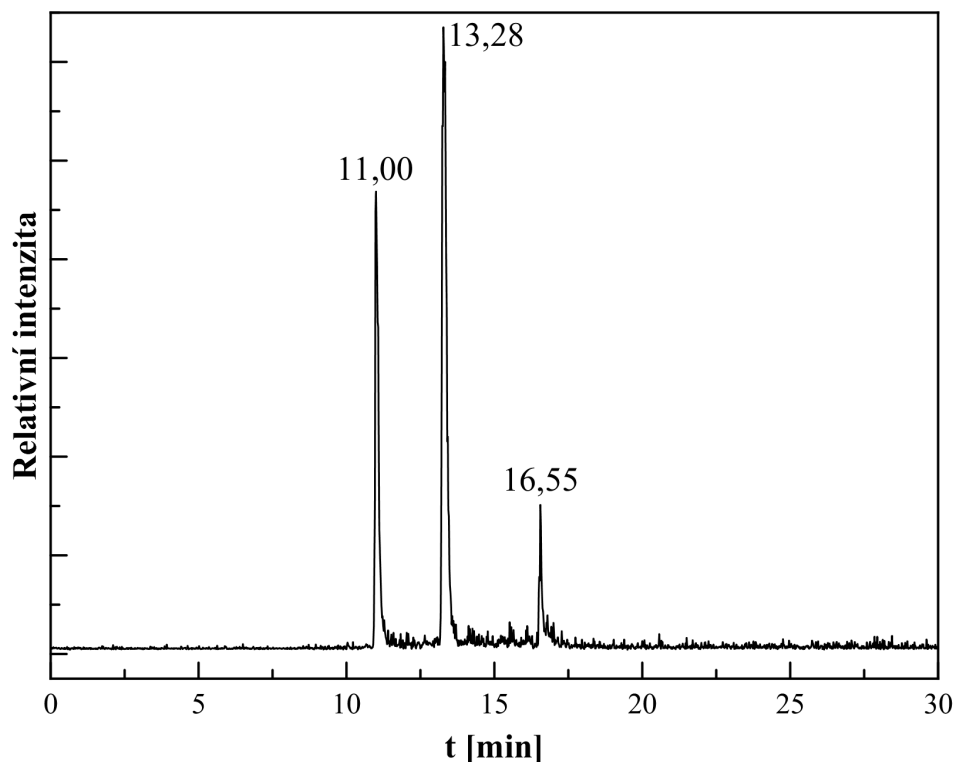
Z chromatogramu reakční směsi (viz obr. 4.46.) vyplývá, že se jedná o složitou směs látek. Obsahuje řadu složek včetně těch se stejnou relativní molekulovou hmotností, kterou mají očekávané produkty reakce.



Obr. 4.46. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s aparaginem. Menší píky s retenčními časy 10,97 min a 16,52 min patří látkám s $M_r = 230$. Jeden méně intenzivní pík s retenčním časem 12,02 min a nejintenzivnější pík v retenčním čase 13,23 min patří látce s $M_r = 248$.

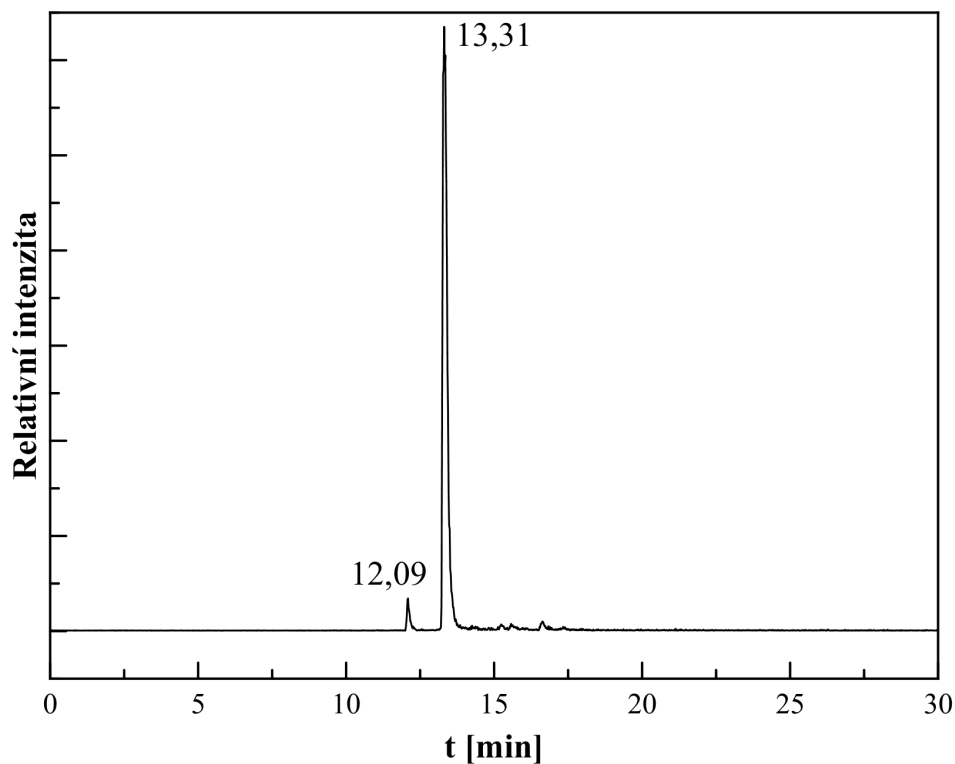
Aby mohla být zaznamenána CID spektra, bylo nutné provést HPLC-MS/MS analýzu, při které byly pomocí MS detekovány pouze zvolené mateřské ionty m/z 231, resp. m/z 249. Ze záznamů celkového iontového proudu byla pak pro nejintenzivnější píky extrahována CID spektra produktů.

V případě **9a** byla získána tři CID spektra z jednotlivých píků (viz obr. 4.47.). CID spektrum získané z píku s retenčním časem 11 min je velmi podobné CID spektru z píku s retenčním časem 13,28 min. Tento pík ale není píkem produktu **9a**, nýbrž se jedná o pík patřící fragmentu m/z 231 pocházejícího z protonované molekuly látky **9b**, resp. **9c**. Spektrum extrahované z píku s retenčním časem 16,55 min se nepodařilo interpretovat.

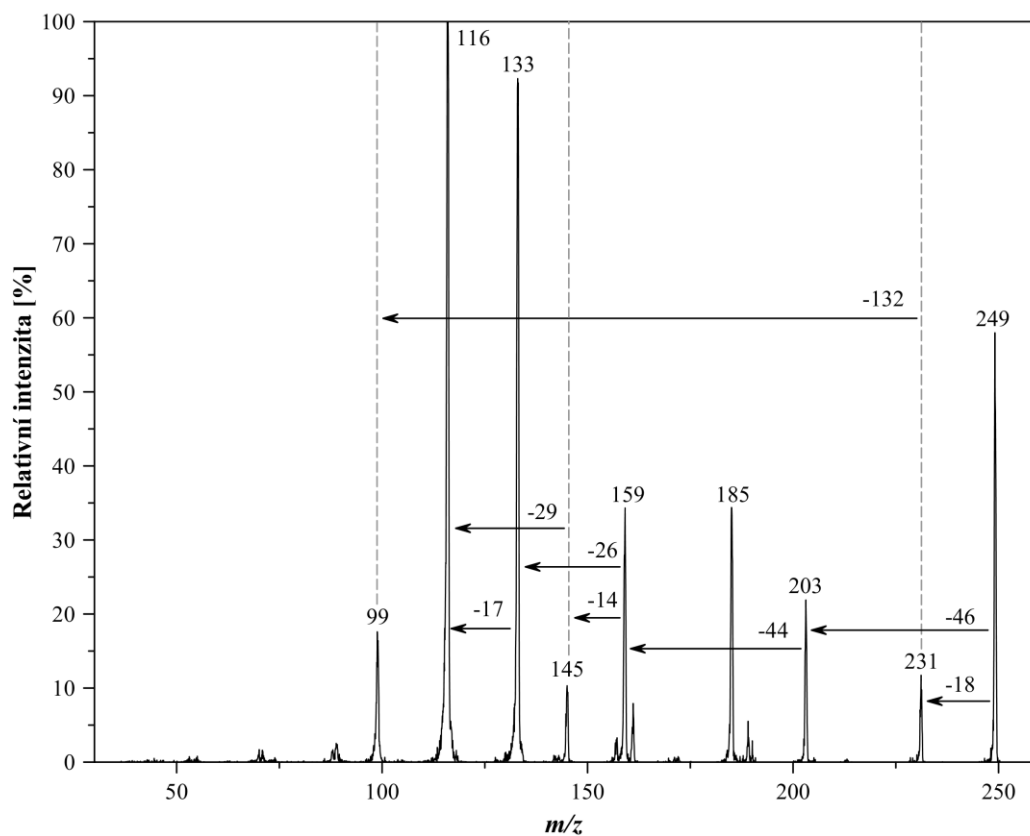


Obr. 4.47. Záznam iontového proudu iontu m/z 231.

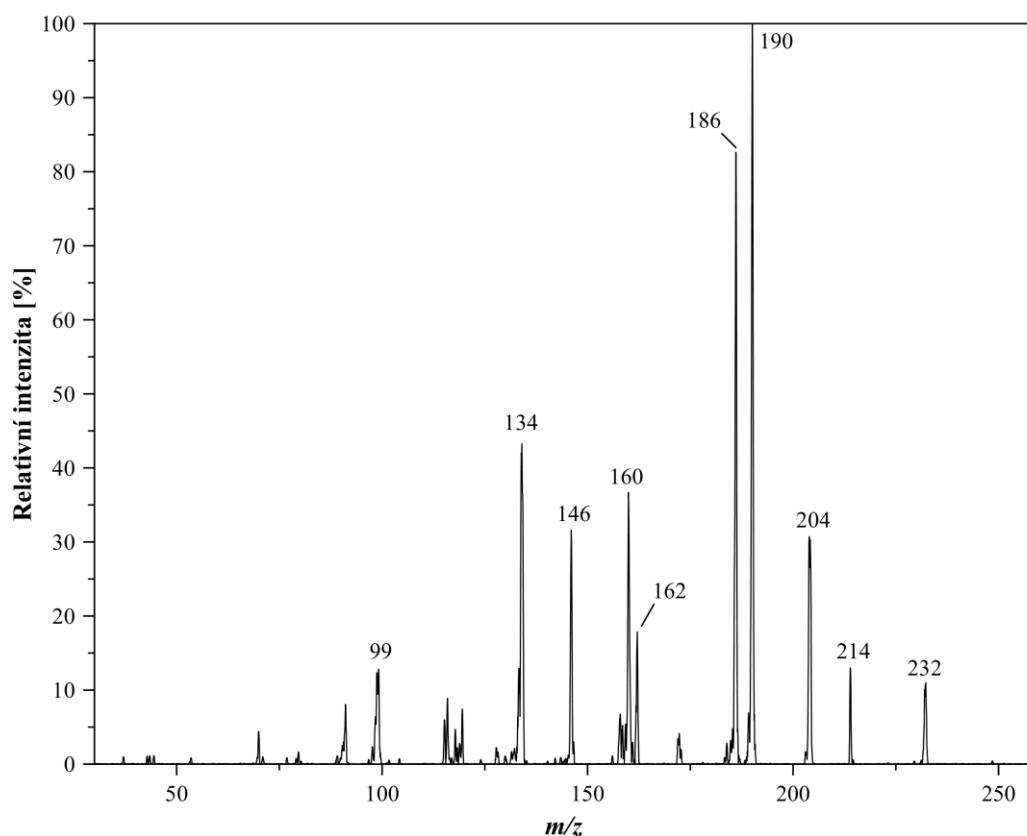
V záznamu iontového proudu m/z 249 (viz obr. 4.48) se objevují pouze dva píky, což naznačuje, že reakcí OPA s Asn vznikají opravdu dva produkty. CID spektrum extrahované z intenzivního píku s retenčním časem 13,31 min (viz obr. 4.49.) je s největší pravděpodobností spektrum produktu **9c**. To plyne především ze ztráty 46, což je s největší pravděpodobností ztráta HCOOH . Další je fragmentace je ale nejasná. CID spektrum na obr. 4.50. extrahované z píku s retenčním časem 12,09 min tedy s největší pravděpodobností patří látce **9b**. Svědčí o tom především absence ztráty mravenčí kyseliny. I v tomto případě se ale nepodařilo spektrum interpretovat.



Obr. 4.48. Záznam iontového proudu iontu m/z 249.



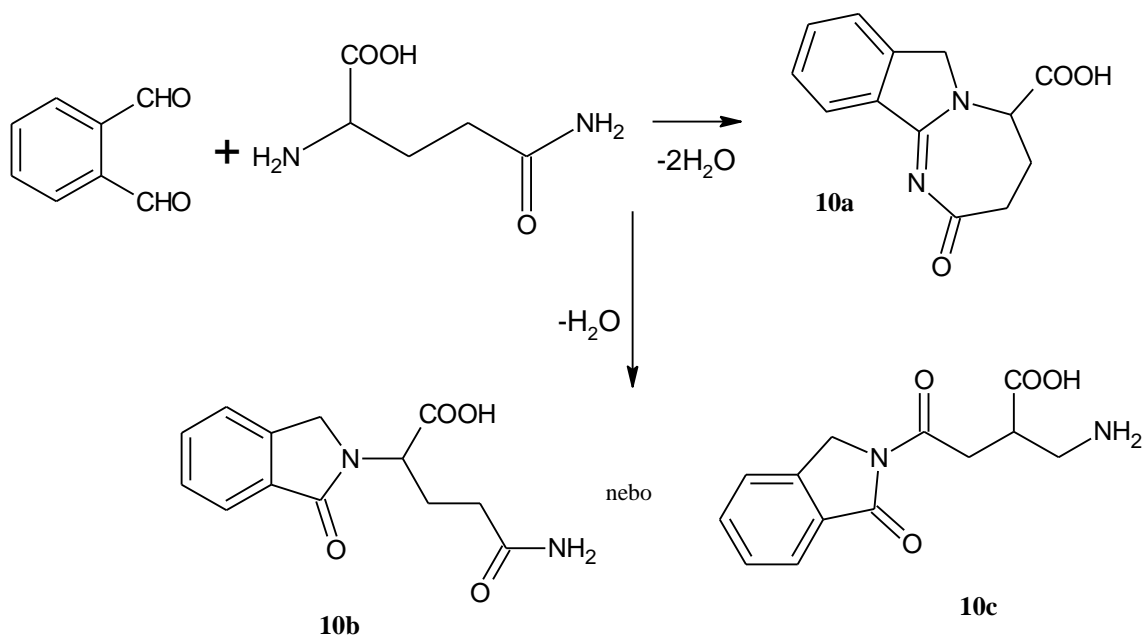
Obr. 4.49. CID spektrum protonovaného produktu **9c**.



Obr. 4.50. CID spektrum protonovaného produktu **9b**.

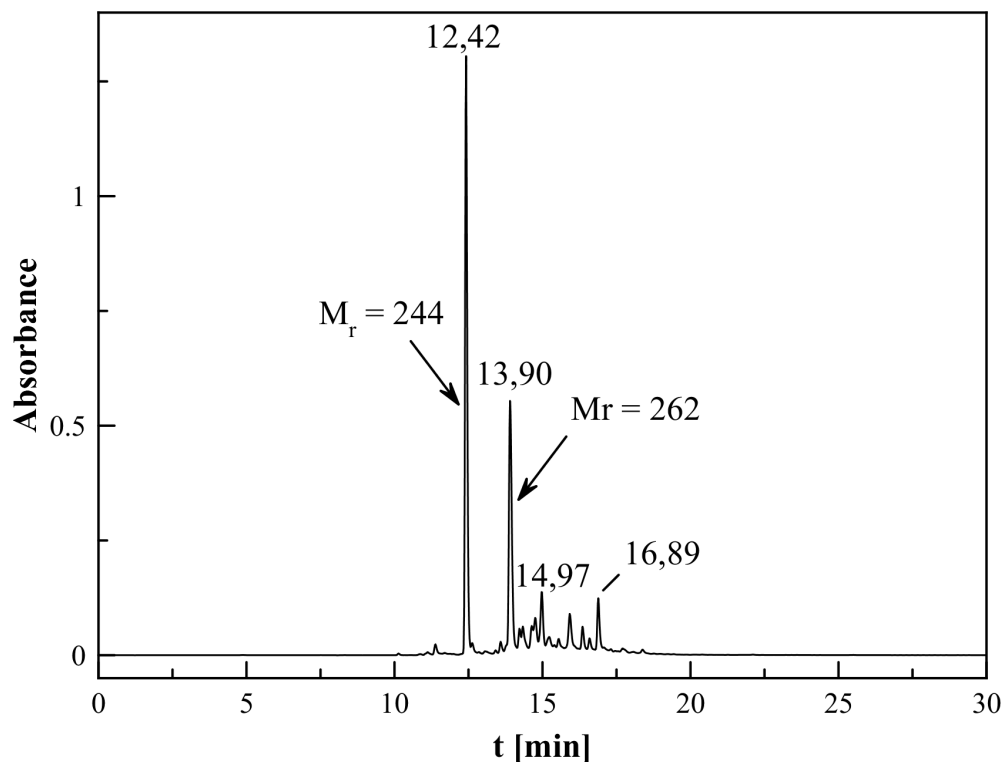
4.10. Reakce OPA s glutaminem

V případě reakce OPA s glutaminem byly taktéž očekávány produkty analogické produktům vznikajícím reakcí OPA s lysinem. Za toho předpokladu by vznikl tricyklický produkt, kdy s jednou molekulou OPA reaguje α -aminoskupina i amidová skupina v postranním řetězci, 2-oxo-2,4,5,7-tetrahydro-3*H*-[1,3]diazepino[2,1-*a*]isoindol-5-karboxylová kyselina (**10a**) s relativní molekulovou hmotností 244. Kromě toho by reakcí vznikaly i produkty s relativní molekulovou hmotností 262, kdy s jednou molekulou OPA reaguje pouze α -aminoskupina nebo amidová skupina. Jedná se o 5-amino-5-oxo-2-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)pentanovou kyselinu (**10b**), resp. 2-(aminomethyl)-4-oxo-4-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)butanovou kyselinu (**10c**). Reakce OPA s glutaminem je znázorněna na obr. 4.51.



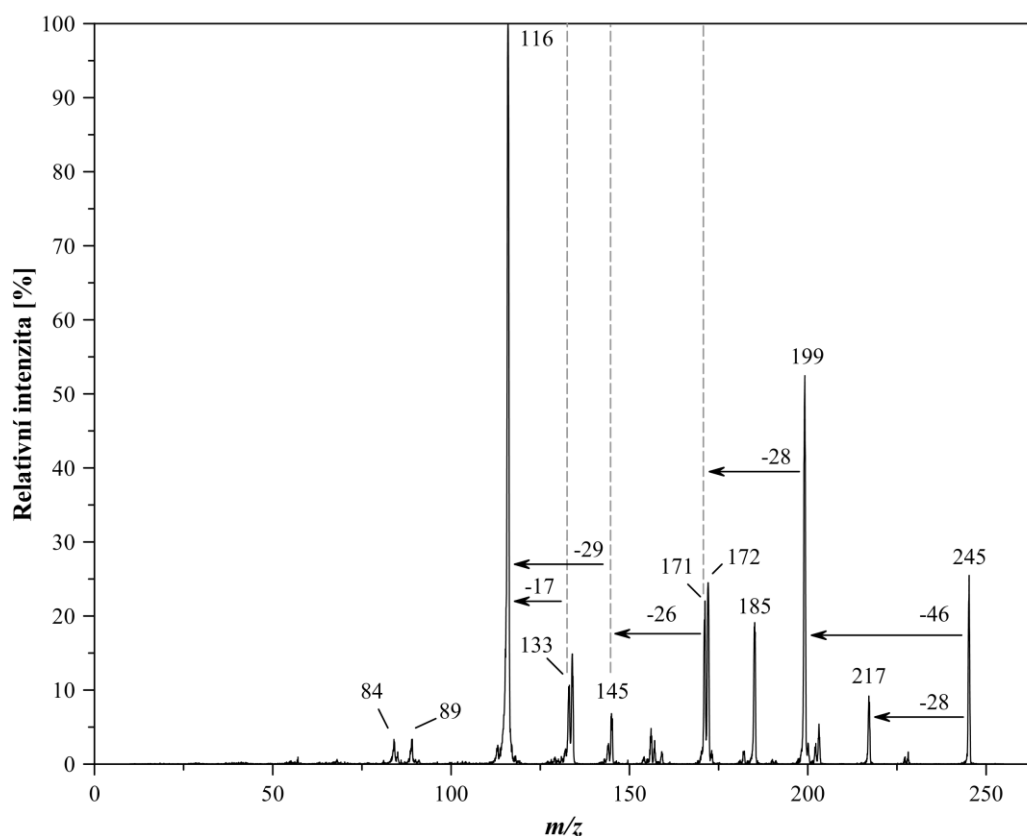
Obr. 4.51. Reakce OPA s glutaminem.

Z chromatogramu vyplývá, že reakční směsi vznikají podle očekávání produkty s relativními molekulovými hmotnostmi 244 a 262 (viz obr. 4.52.). V tomto případě jsou oba druhy očekávaných produktů dobře rozděleny, nicméně i v tomto případě má několik nečistot stejnou molekulovou hmotnost jako **10b**, resp. **10c**. Intenzivnější pík s retenčním časem 12,42 min patří tricyklickému produktu **10a**, zatímco **10b** a **10c** jsou ukryty v píku s retenčním časem 13,90 min.

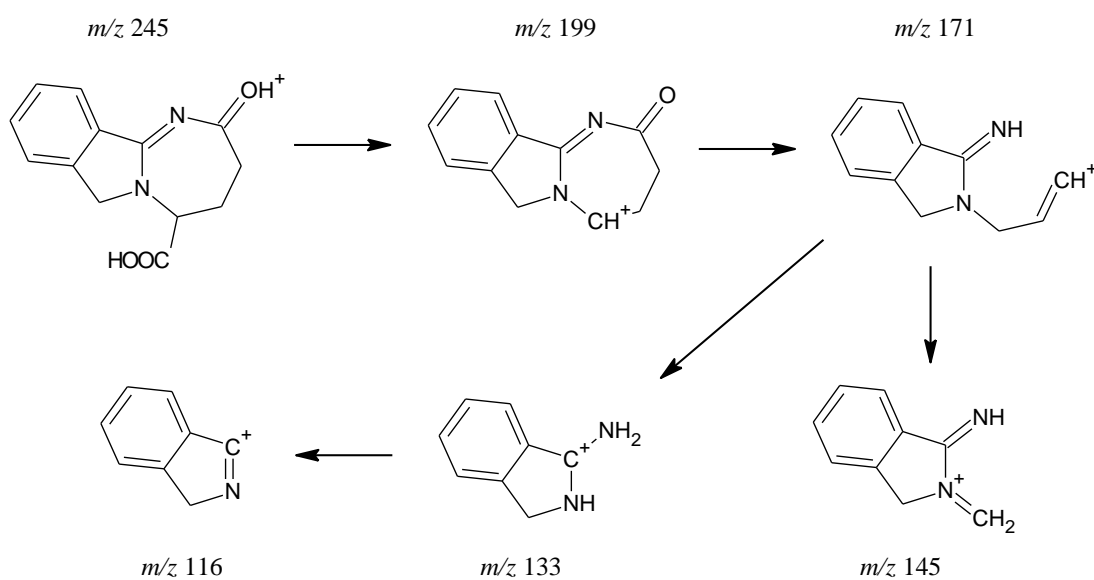


Obr. 4.52. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s glutaminem.

10a má poměrně bohaté CID spektrum (viz obr. 4.53.). Fragmentace je analogická fragmentaci tricyklického produktu vznikajícího reakcí OPA s asparaginem. Nejprve dochází k eliminaci molekuly mravenčí kyseliny z protonované molekuly m/z 245 za vzniku fragmentu m/z 199. Dále je rozštěpen sedmičlenný cyklus a vzniká fragment m/z 171. Ten se dále štěpí za tvorby fragmentů m/z 145 a m/z 133. Fragment m/z 133 se může rozpadat za vzniku iontu m/z 116. Schéma fragmentace viz obr. 4.54.



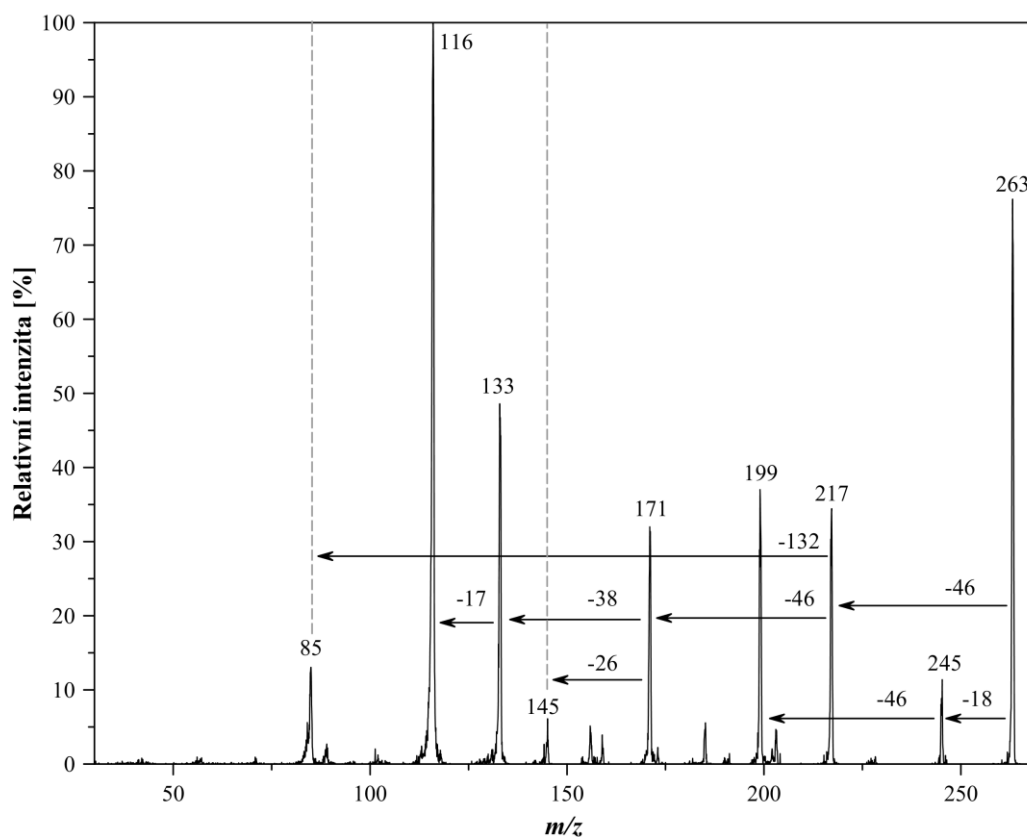
Obr. 4.53. CID spektrum protonované molekuly **10a**.



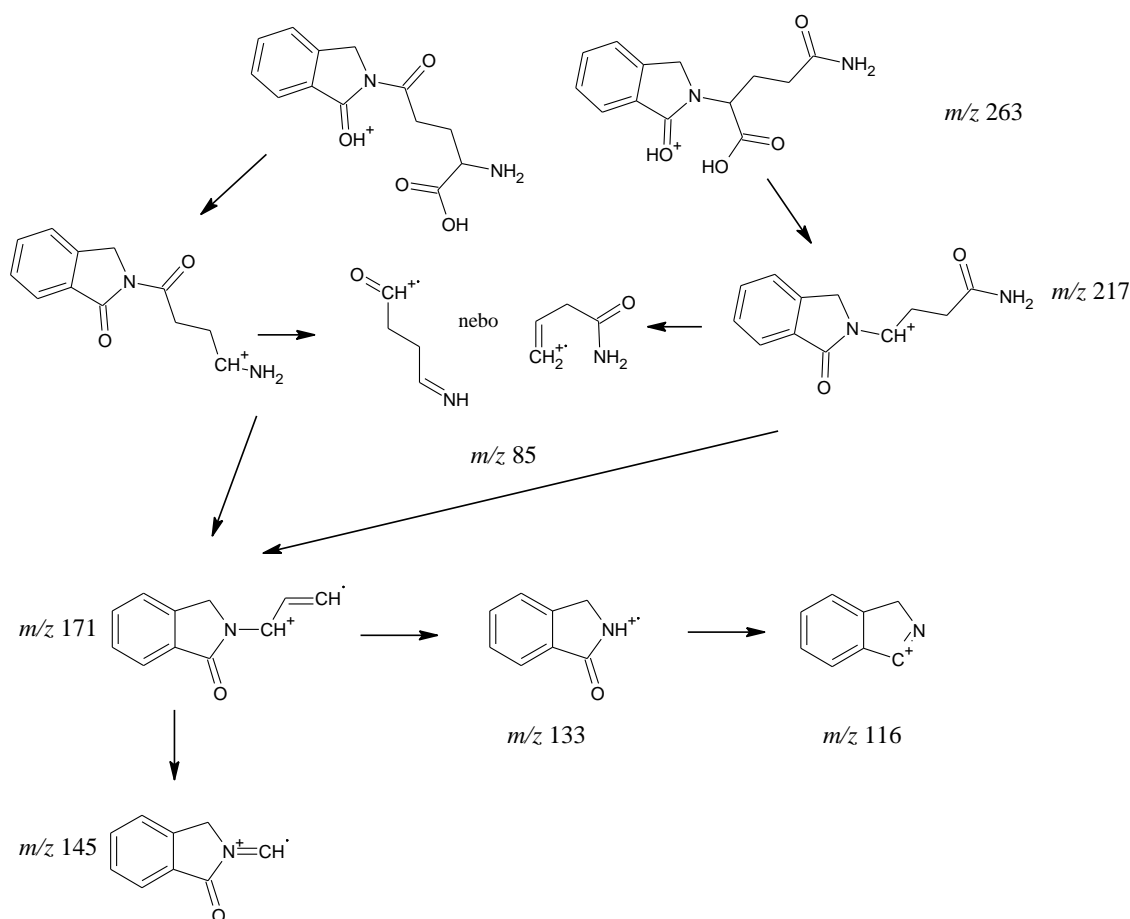
Obr. 4.54. Schéma fragmentace protonované molekuly **10a**.

V případě **10b**, resp. **10c** bylo CID spektrum zaznamenáno stejně jako v případě produktů OPA s asparaginem pomocí HPLC-MS/MS analýzy. I fragmentace toho produktu je poměrně složitá a stejně tak v tomto případě nelze rozlišit, jestli se jedná o CID spektrum **10b**, nebo **10c**. CID spektrum viz obr. 4.55. Protonovaná molekula

m/z 263 může fragmentovat za vzniku iontu m/z 245, který pak fragmentuje dál jako **10a**, nebo může docházet ke ztrátě mravenčí kyseliny za vzniku fragmentu m/z 217. Z tohoto fragmentu se může odštěpovat alifatický řetězec, který se objevuje ve spektru jako kation-radikál m/z 85, ale také může vznikat kation-radikál m/z 171. Z toho vznikají kation-radikály m/z 145 a m/z 133. Posledně jmenovaný fragment se pak dál štěpí za tvorby iontu m/z 116, který je nejintenzivnějším píkem spektra. Schéma fragmentace viz obr. 4.56.



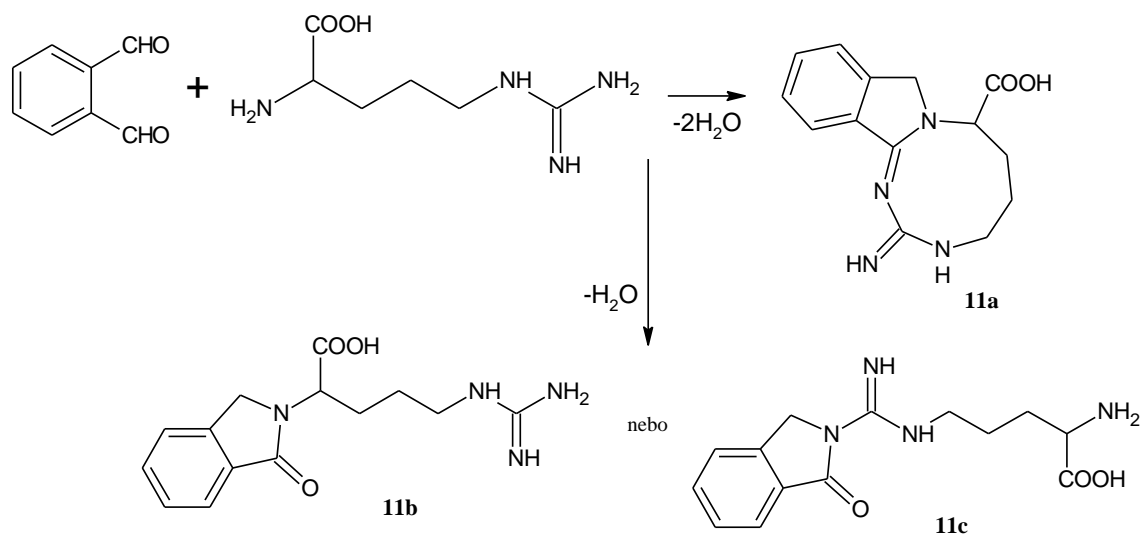
Obr. 4.55. CID spektrum protonované molekuly **10b**, resp. **10c**.



Obr. 4.56. Schéma fragmentace protonované molekuly **10b**, resp. **10c**.

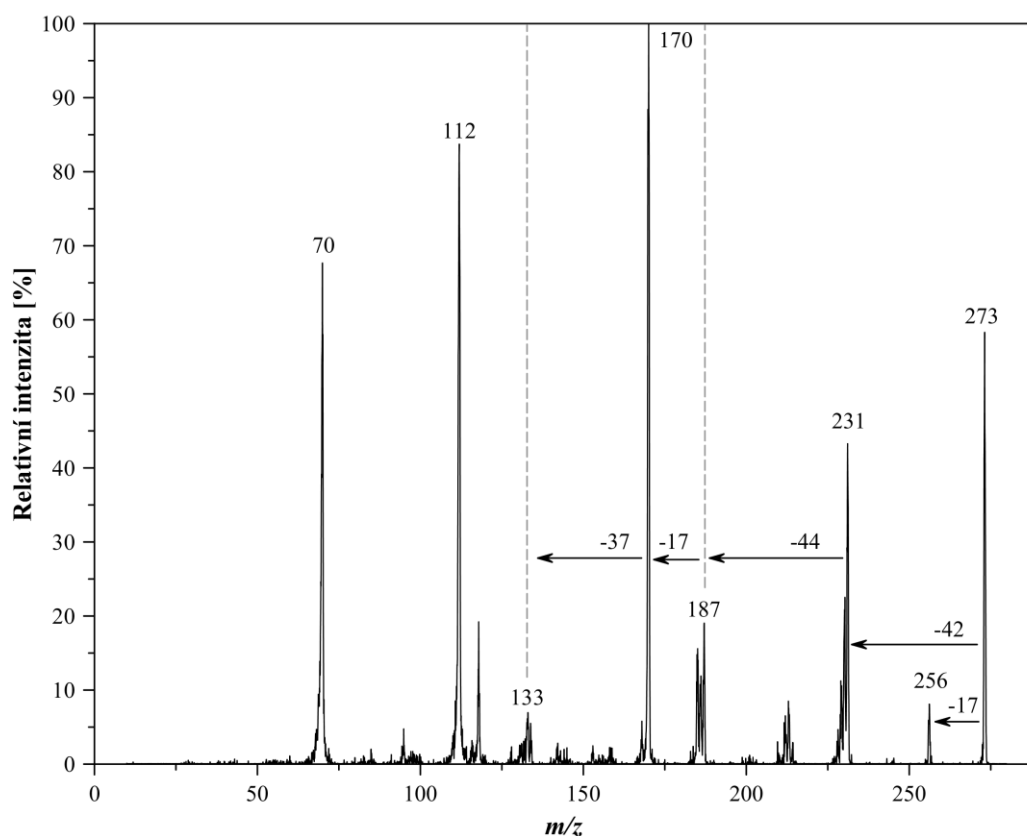
4.11. Reakce OPA s argininem

Arginin reaguje s OPA za vzniku dvou produktů, které jsou analogické produktům reakcí OPA s lysinem, asparaginem a glutaminem. Jejich struktura je navržena v reakčním schématu na obr. 4.57. Produkty reakce jsou tricyklický produkt (1*Z*)-2-imino-2,4,5,6,7,9-hexahydro-3*H*-[1,3,5]triazonino[2,1-*a*]isoindol-7-karboxylová kyselina (**11a**), která má relativní molekulovou hmotnost 272 a isoindolové deriváty vzniklé reakcí pouze jedné z aminoskupin s OPA: 5-karbamimidamido-2-(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)pentanová kyselina (**11b**), která vzniká reakcí α -aminoskupiny s OPA, a 2-amino-5-{[imino(1-oxo-1,3-dihydro-2*H*-isoindol-2-yl)methyl]amino}pentanová kyselina (**11c**), která vzniká reakcí aminoskupiny v postranním řetězci s OPA. Oba posledně jmenované produkty mají relativní molekulovou hmotnost 290.



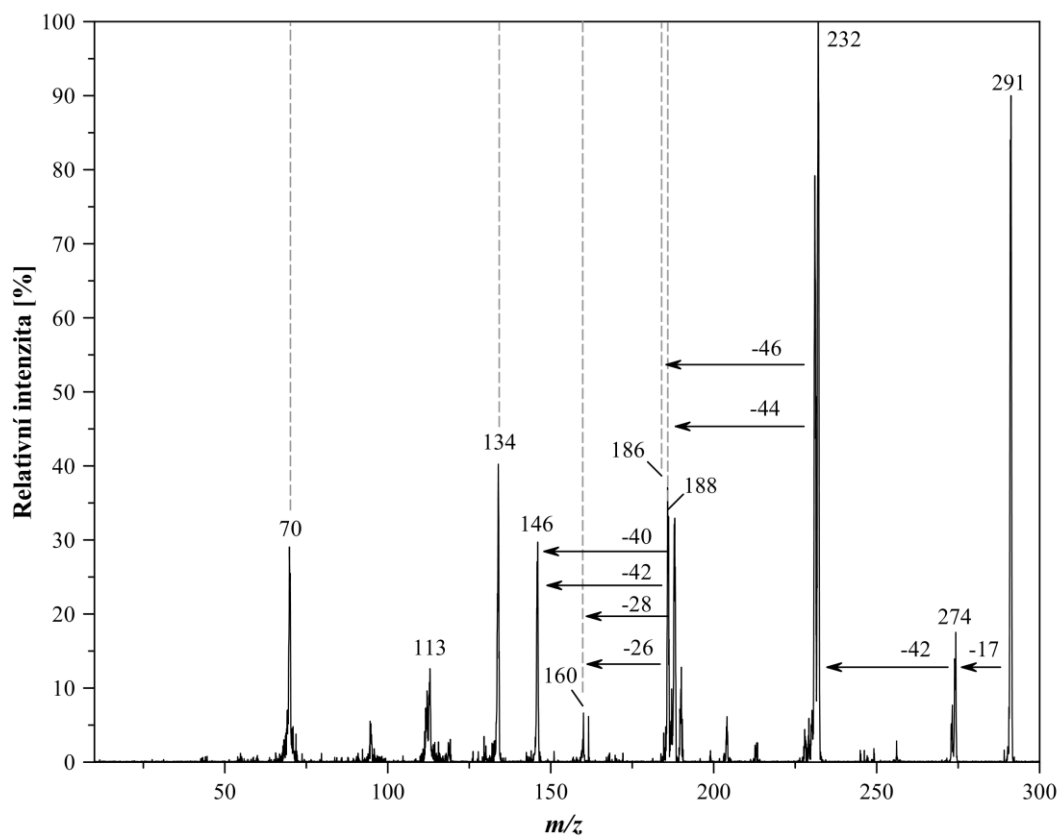
Obr. 4.57. Reakce OPA s argininem.

Ani jeden z produktů nebylo možno izolovat, a tak mohla být zaznamenána pouze CID spektra. V případě **11a** není CID spektrum zcela jasné (viz obr. 4.58.), ale naznačuje, že se opravdu jedná o tricycklý produkt. To vyplývá především z počáteční ztráty fragmentu o hmotě 42 místo ztráty celého guanidinu s relativní molekulovou hmotností 59. Další fragmentace je velmi složitá a její interpretace by vyžadovala znalost elementárního složení, které lze zjistit pouze ze spekter s vysokým rozlišením.



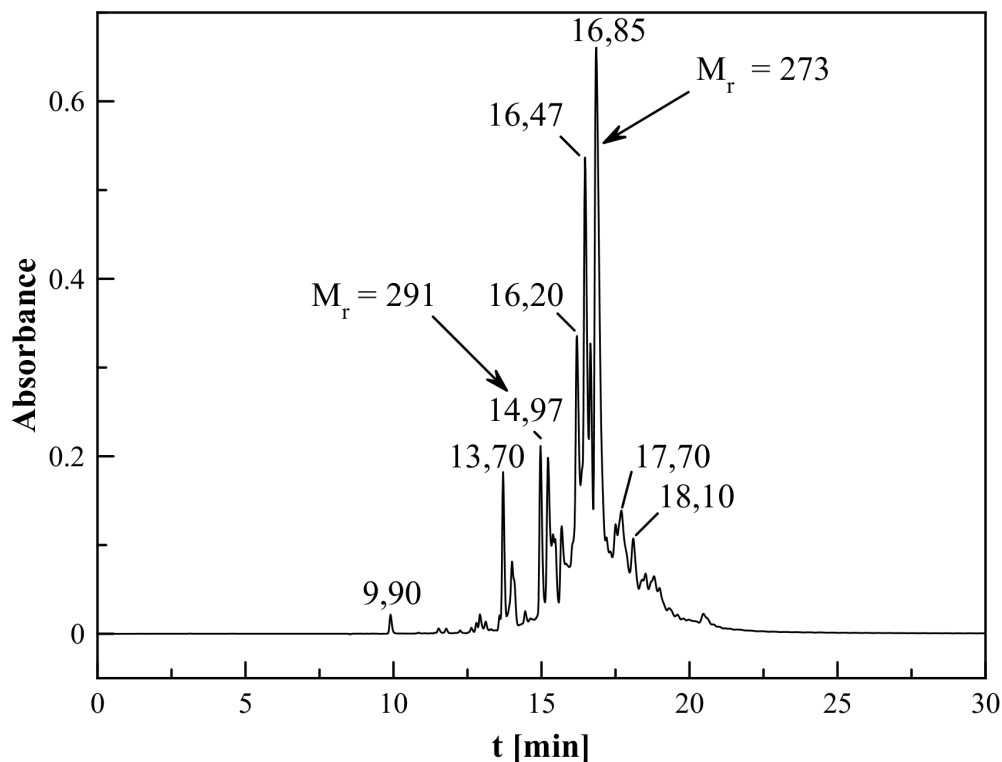
Obr. 4.58. CID spektrum protonované molekuly **11a**.

I CID spektrum směsi produktů **11b** a **11c** je velmi složité a těžko interpreovatelné (viz obr. 4.59.). Přítomnost fragmentů m/z 160, m/z 146 a m/z 134 naznačuje, že se může opravdu jednat o isoindolové analogy produktů reakcí OPA s jednoduchými AAs. Ve spektru je nicméně i další fragmentace, kterou se nepodařilo interpretovat a která by mohla být argumentem proti vzniku produktů **11b** a **11c**.



Obr. 4.59. CID spektrum směsi produktů **11b** a **11c**.

Z chromatogramu reakční směsi je patrné, že kromě produktů obsahuje směs i mnoho nečistot (viz obr. 4.60.). Produktu **11a** patří pík s retenčním časem 16,85 min a produktům **11b** a **11c** pík s retenčním časem 14,94 min.

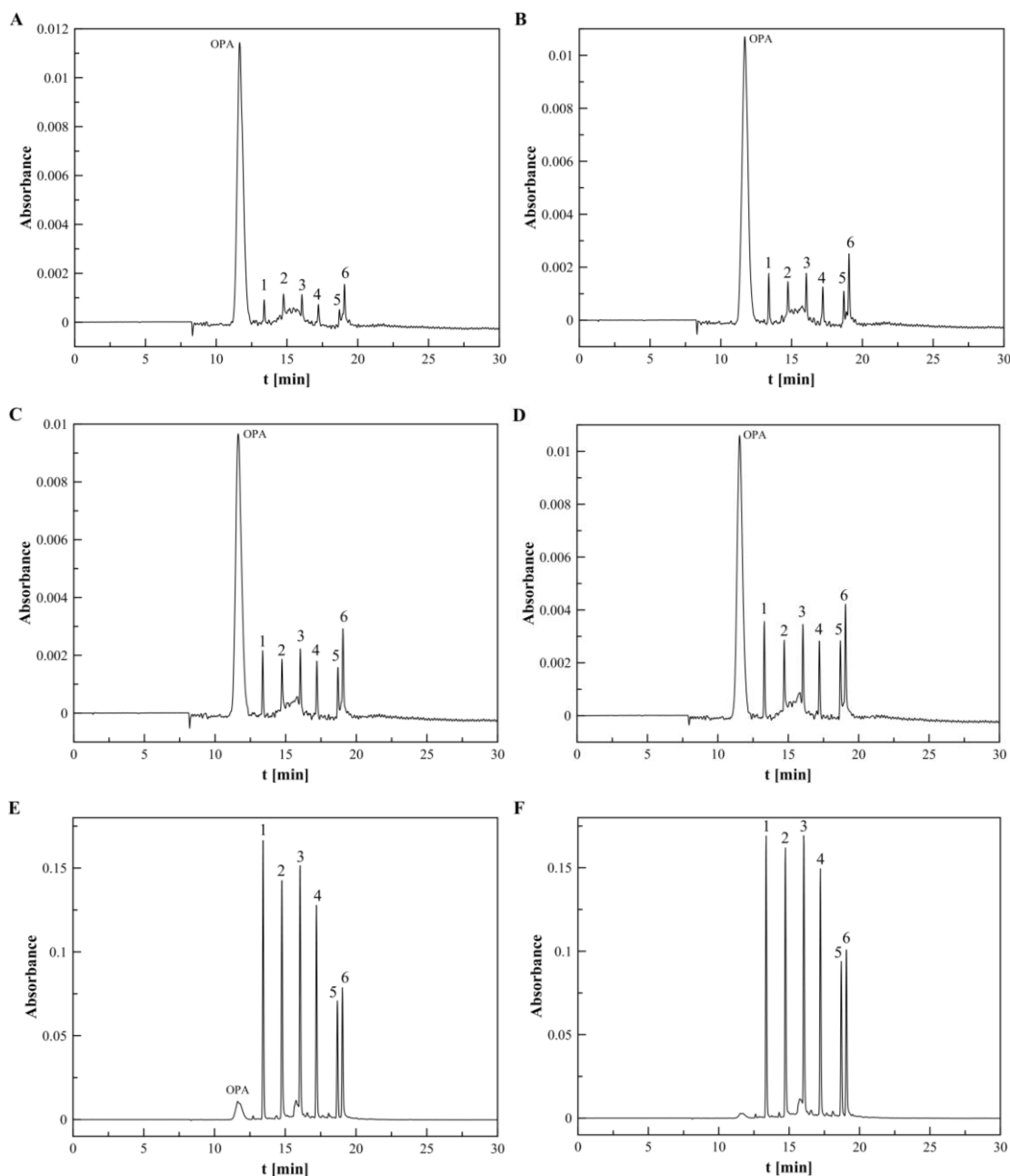


Obr. 4.60. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s argininem.

4.12. Reakce OPA se směsí AAs

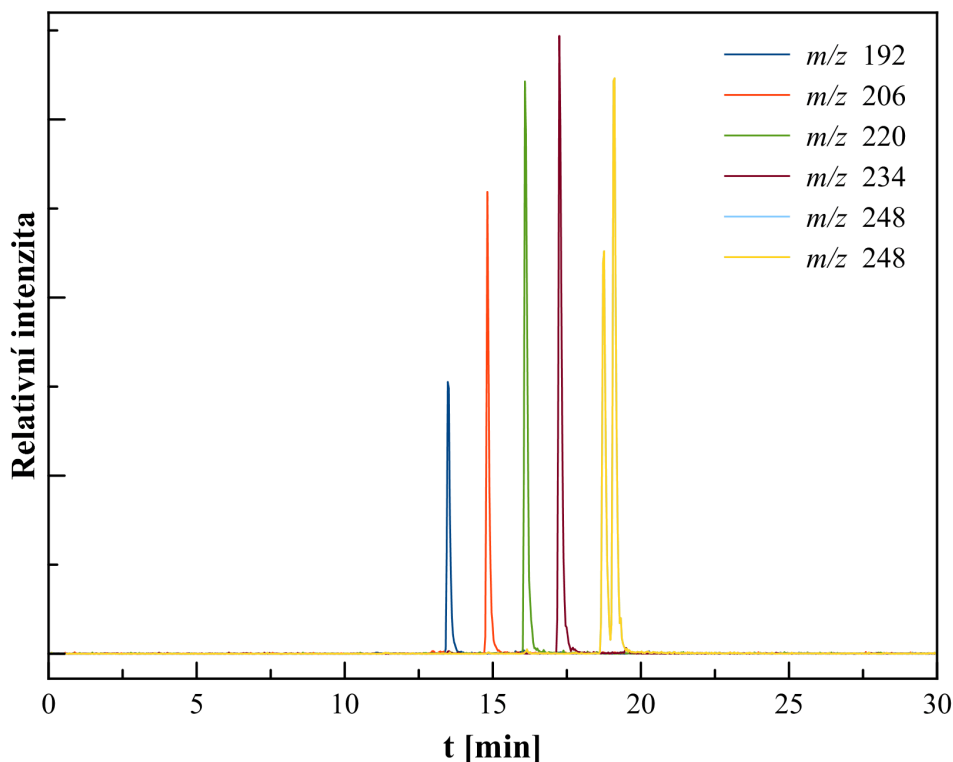
Na závěr byly provedeny reakce OPA se směsí glycinu, alaninu, α -aminomáselné kyseliny, valinu, leucinu, isoleucinu a OPA se směsí lysinu, asparaginu, glutaminu a argininu.

Průběh reakce OPA se směsí glycinu, alaninu, α -aminomáselné kyseliny, valinu, leucinu a isoleucinu byl pořízen pomocí RP-HPLC a je znázorněn na obr. 4.61. Je patrné, že každá AA reakcí s OPA poskytuje pouze jeden produkt, jejich píky jsou od sebe dobře rozděleny a retenční časy jednotlivých produktů byly zachovány. Všechny reakce probíhají relativně pomalu, i po dvou týdnech od smíchání roztoků OPA se směsí AAs se v chromatogramu objevuje nepatrný pík OPA (chromatogram F).



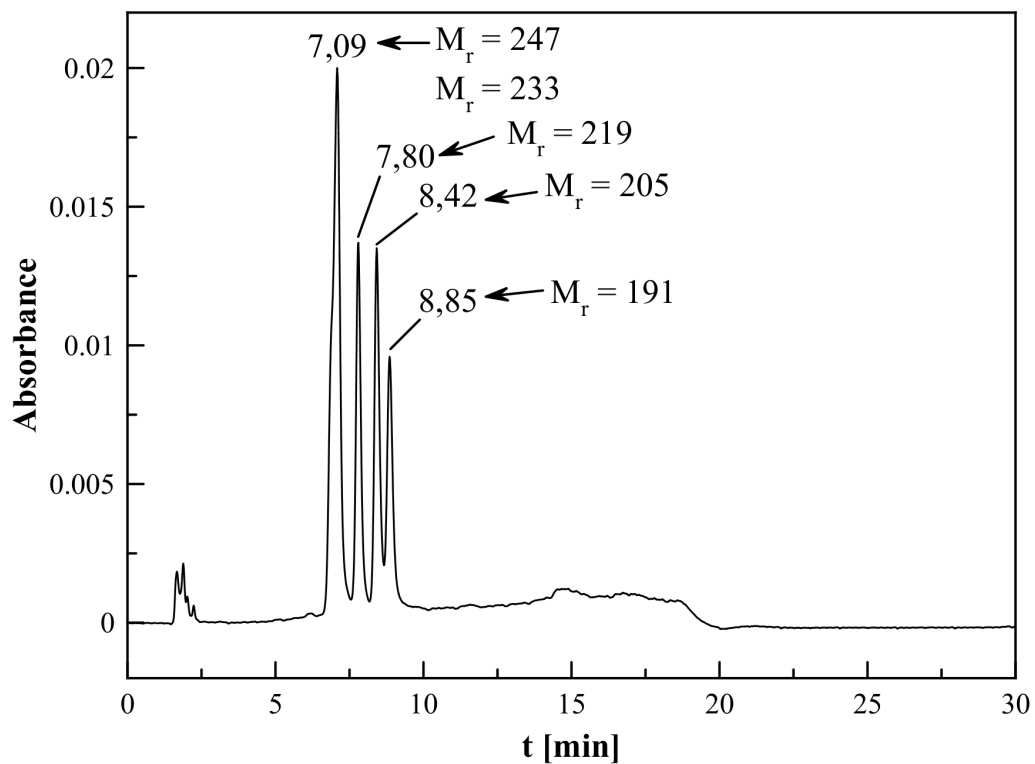
Obr. 4.61. Průběh reakce OPA se směsí jednoduchých AAs. Chromatogramy byly získány pomocí RP-HPLC. Vzorky reakční směsi byly odebrány v různých časech po smíchání OPA se směsí AAs: A – 40 min, B – 1 hod 20 min, C – 2 hod, D – 3 hod 20 min, E – týden, F – 2 týdny. Všechny reakce poskytují pouze jeden produkt: 1 – OPA + glycin, 2 – OPA + alanin, 3 – OPA + α -aminomáselná kyselina, 4 – OPA + valin, 5 – OPA + isoleucin, 6 – OPA + leucin.

Na obr. 4.62. je souhrn jednotlivých záznamů iontového proudu všech produktů. Produkty reakcí OPA s leucinem a isoleucinem se překrývají, jelikož oba produkty jsou strukturními izomery a pomocí MS je nelze od sebe rozlišit.

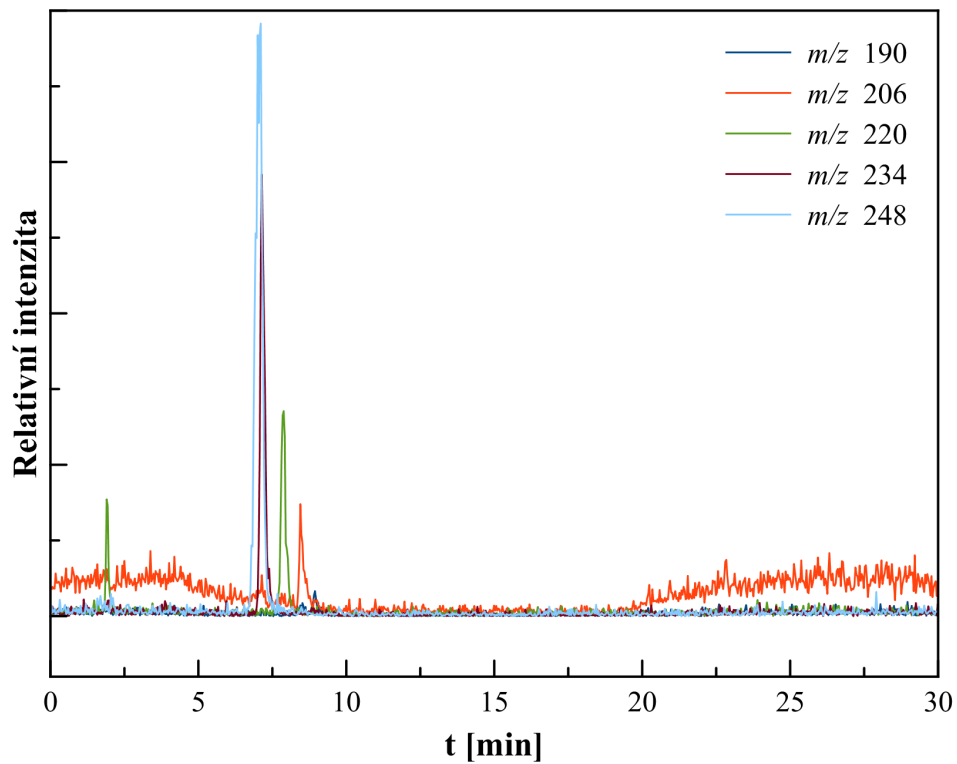


Obr. 4.62. Souhrn záznamů iontových proudů jednotlivých m/z odpovídajících produktům reakcí použitých AAs s OPA.

V případě kolony Acclaim™ HILIC-10 už není separace tolik účinná (viz obr. 4.63.). Jednotlivé produkty nejsou příliš dobře rozděleny, produkty **5**, **6** a **7** nejsou rozděleny vůbec. To je způsobeno především nízkou polaritou těžších produktů. Analýza na koloně Acclaim™ HILIC-10 se tedy ukázala být nepříliš vhodnou metodou pro analýzu produktů reakcí OPA s jednoduchými AAs. Na obr. 4.64. je souhrn jednotlivých záznamů iontových proudů příslušných m/z .



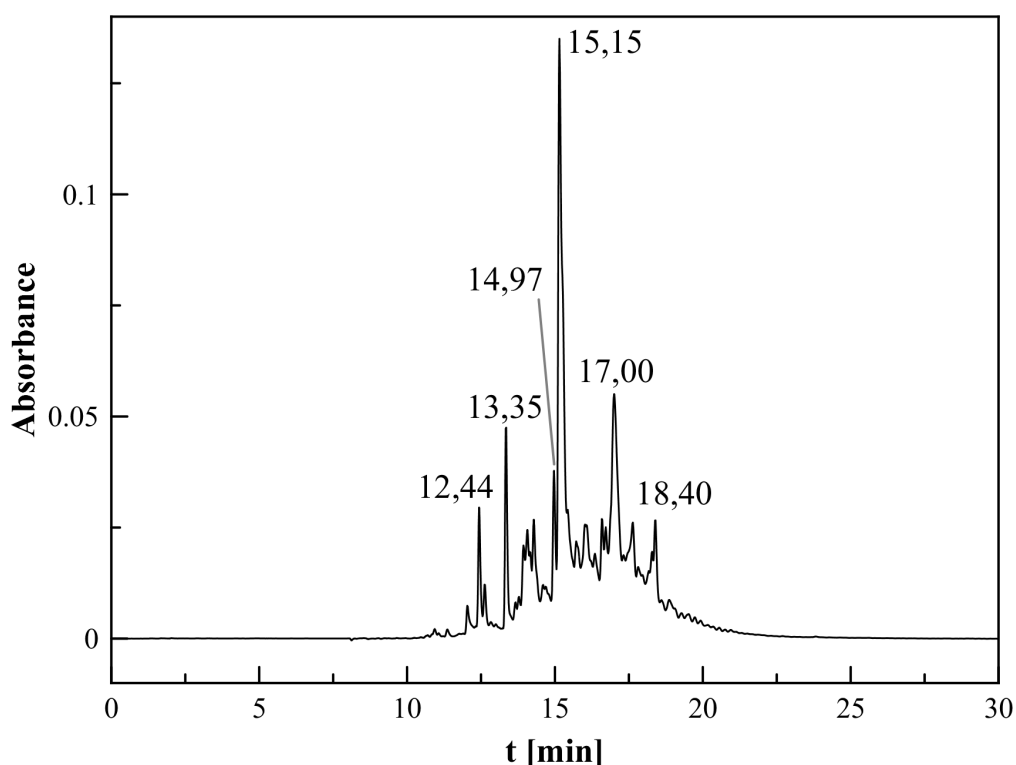
Obr. 4.63. Chromatogram (HILIC) reakční směsi OPA s jednoduchými AAs.



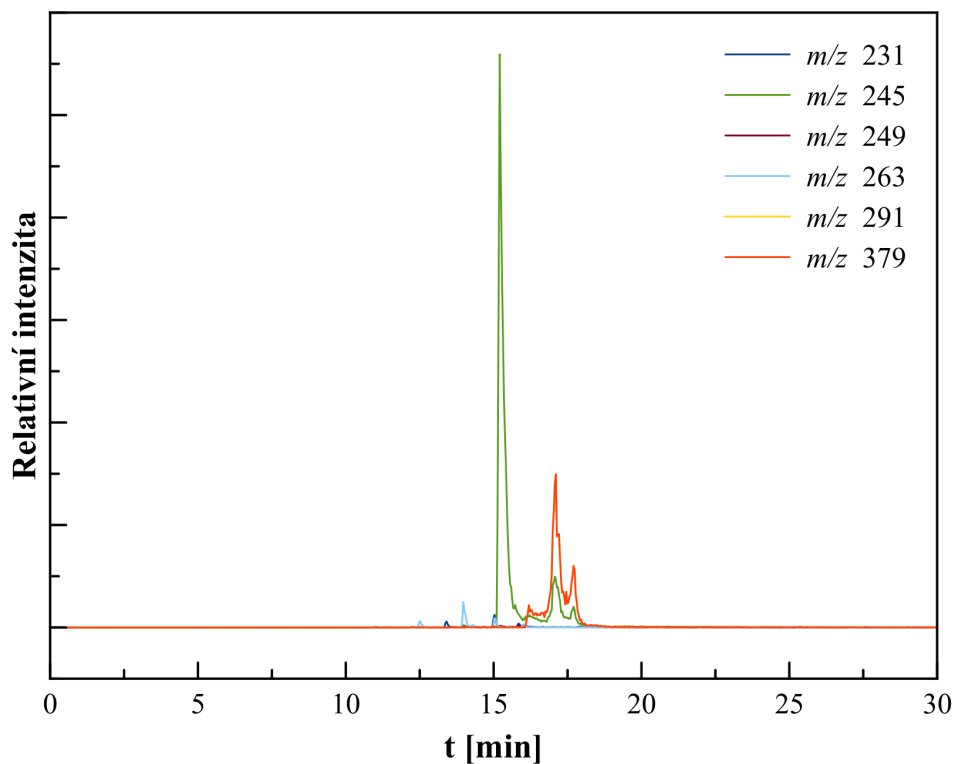
Obr. 4.64. Souhrn záznamů iontových proudů m/z odpovídajících produktům reakcí.

Vzhledem k použitým látkovým množstvím OPA a AAs (viz kapitola 3.4.2.) by měla být směs produktů po zreagování veškerého OPA ekvimolární.

V případě souhrnné reakce OPA s lysinem, asparaginem, glutaminem a argininem je chromatogram získaný metodou RP-HPLC (viz obr. 4.65) mnohem složitější z důvodu vzniku mnoha produktů. Jednotlivé produkty od sebe nejsou příliš dobře odděleny a přiřazení píků k jednotlivým produktům je téměř nemožné. To vyplývá také ze souhrnu jednotlivých záznamů iontových proudů (viz obr. 4.66.), ze kterého je patrné, že píky některých hmot se zcela překrývají, v mnoha případech mají jednotlivé hmoty píků hned několik. Produkt reakce OPA s argininem s m/z 273 navíc zcela chybí. To je pravděpodobně způsobeno tím, že je produkt příliš nestálý. Po smíchání reakčních směsí se totiž ve spektru objevoval s dostatečnou intenzitou, ale po týdnu ze směsi úplně vymizel. Reakce OPA s těmito AAs probíhají mnohem rychleji než u jednoduchých AAs použitých v předešlé souhrnné reakci. I v této reakční směsi by měla v ideálním případě vzniknout ekvimolární směs produktů.

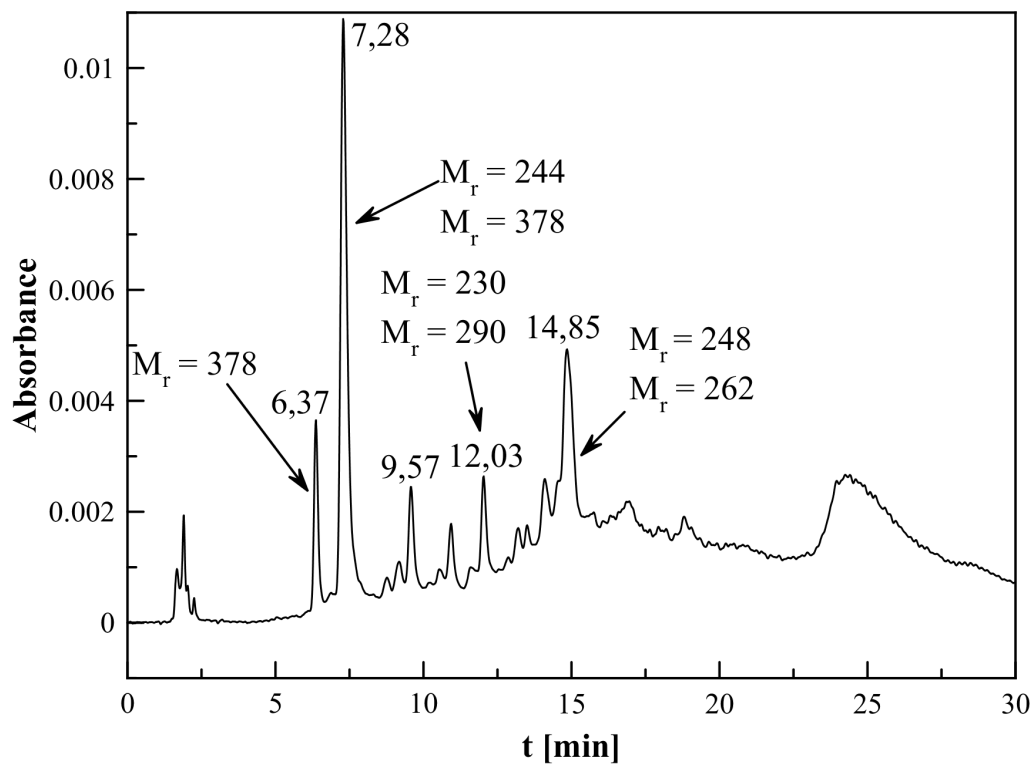


Obr. 4.65. Chromatogram (RP) reakční směsi OPA s lysinem, asparaginem, glutaminem a argininem.

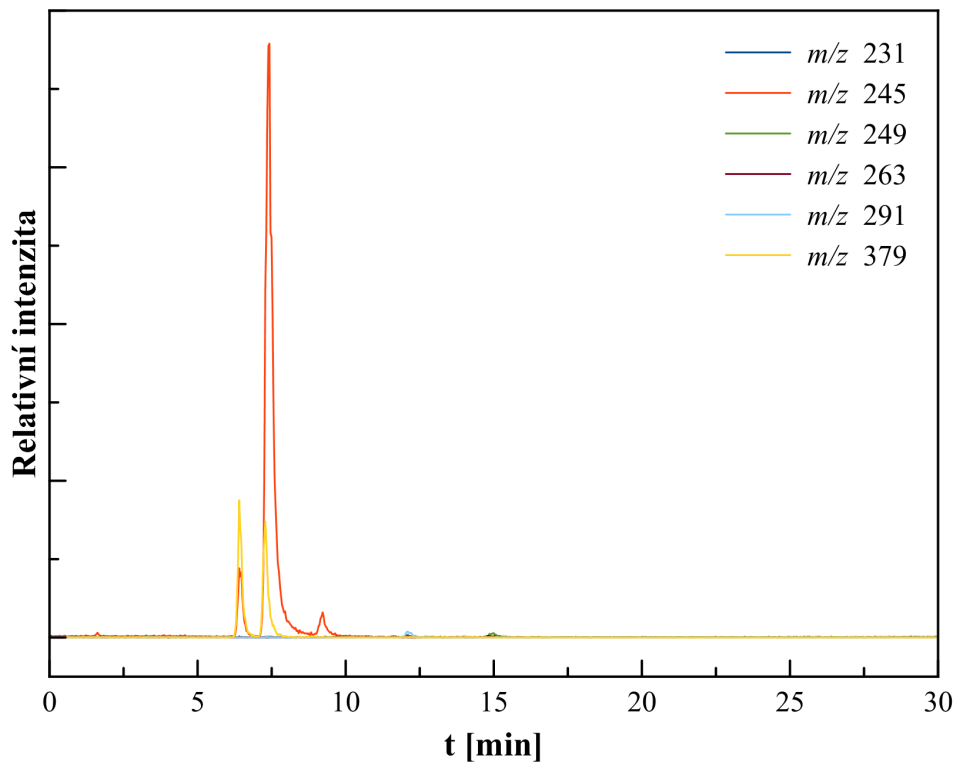


Obr. 4.66. Souhrn záznamů iontových proudů jednotlivých m/z odpovídajících produktům reakce.

Díky vyšší polaritě produktů reakcí OPA se složitějšími AAs byla separace na koloně Acclaim™ HILIC-10 mnohem úspěšnější (viz obr. 4.67.). Produkty jsou relativně lépe rozděleny, takže je možné přiřazení jednotlivých píků k daným produktům. I tak se ale některé produkty od sebe nedělí a eluují společně. Na obr. 4.68. je souhrn záznamů iontových proudů iontů s odpovídající m/z .



Obr. 4.67. Chromatogram (HILIC) reakční směsi OPA se složitějšími AAs.



Obr. 4.68. Souhrn záznamů iontových proudů iontů s m/z odpovídající produktům reakce OPA s AAs.

5. Závěr

Byly studovány reakce OPA s vybranými AAs. Produkty těchto reakcí byly analyzovány pomocí spojení HPLC s MS. Jednoduché AAs (bez nukleofilních skupin v postranním řetězci) poskytovaly při reakci s OPA jeden produkt s dihydroisoindolovou strukturou. Při reakcích složitějších AAs (s další aminoskupinou v postranním řetězci) s OPA byly očekávány analogické produkty, nicméně bylo zjištěno, že kromě očekávaných struktur se tvoří i produkty, které vznikají reakcí obou aminoskupin. Tyto produkty jsou pak hlavními produkty reakce. Nebyl vyloučen ani vznik dalších produktů vznikajících interakcí jedné molekuly AA se dvěma molekulami OPA.

V případě reakcí OPA s glycin ethyl esterem, α -aminomáselnou kyselinou, leucinem, lysinem, asparaginem, glutaminem a argininem byly připraveny zcela nové látky, které se podařilo v různém rozsahu strukturně analyzovat. Z reakčních roztoků OPA s α -aminomáselnou kyselinou, valinem, leucinem, isoleucinem a lysinem se podařilo izolovat relativně čisté produkty ve formě krystalů, popř. prášku. Tyto produkty pak byly podrobeny strukturní analýze NMR, která potvrdila jejich navržené struktury.

Modelové reakční směsi jednoduchých i složitých AAs s OPA byly následně analyzovány nejen pomocí RP-HPLC, ale také na koloně se stacionární fází typu HILIC. Produkty reakcí jednoduchých AAs se mnohem lépe dělily na koloně pro RP-HPLC analýzu, zatímco v případě polárnějších produktů reakcí složitějších AAs bylo dosaženo mnohem lepšího dělení na koloně HILIC.

Z výsledků samostatných i souhrnných reakcí vyplývá, že derivatizace směsi AAs OPA s fluorimetrickou detekcí není příliš vhodná metoda ke kvantifikaci. I přes to je tato metoda hojně používána ke stanovení obsahu AAs a dalších primárních aminů v biologickém materiálu. [1 – 4, 8] Reakcí OPA s různými AAs vznikají různé sloučeniny obsahující různé chromofory a přes to, že se v mnoha případech jedná o strukturně podobné látky, absorpce záření z UV lampy se liší (viz obr. 4.61. a 4.65.). Přítomnost složitějších AAs celou detekci navíc komplikuje vznikem několika strukturně různých produktů v různých poměrech, jejichž molární absorpční koeficienty se zcela jistě také liší, soudě podle různých počtů cyklů v molekule. Kvantifikace touto metodou by byla tedy možná pouze tehdy, byla-li by kvantifikována pouze jedna AA a vlnová délka záření by byla zvolena podle jejího absorpčního maxima, nebo byl-li by k dispozici příslušný standard.

Seznam použité literatury

1. Phthaldialdehyde. Bezpečnostní list podle nařízení (ES) č. 1907/2006, verze 5.1.
2. Halawa, I.; Baig, S.; Qureshi, G. A.: *Biomed. Chromatogr.* **5**, 216 (1991).
3. Pereira, V.; Pontes, M.; Câmara, J. S.; Marques, J. C.: *J. Chromatogr. A* **1189**, 435 (2008).
4. Qureshi, G. A.; Qureshi, A. R.; Bergstorm, J.: *J. Pharmaceut. Biomed.* **7**, 377 (1989).
5. Qureshi, G. A.; Fohlin, L.; Bergström, J.: *J. Chromatogr.* **297**, 91 (1984).
6. Terlink, T.; Hennekes, M. W. T.; van Leeuwen, P. A. M.; Houdijk, A.: *Clin. Chim. Acta* **218**, 159 (1993).
7. Simons Jr., S. S.; Johnson D. F.: *J. Org. Chem.* **43**, 2886 (1978).
8. Iida, Y.; Ikeda, M.; Aoto, M.; Satoh, I.: *Talanta* **64**, 1278 (2004).
9. Lerones, C.; Mariscal, A.; Carnero, M.; García-Rodríguez, A.; Fernández-Crehuet, J.: *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 984 (2004).
10. Shackelford, J. C. N.; Hanlon, G. W.; Maillard, J.-Y.: *J. Antimicrob. Chemoth.* **57**, 335 (2006).
11. Rutala, W. A.; Weber, D. J.: *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 348 (2001).
12. Simões, M.; Simões, L. C.; Cleto, S.; Machado, I.; Pereira, M. O.; Vieira, M. J.; *J. Basic. Microb.* **47**, 20 (2007).
13. Walsh, S. E.; Maillard, J.-Y.; Russell, A. D.: *J. Appl. Microbiol.* **86**, 1039 (1999).

14. Akamatsu, T.; Minemoto, M.; Uyeda, M.: *J. Int. Med. Res.* **33**, 178 (2005).
15. Walsh, S. E.; Maillard, J.-Y.; Simons, C.; Russell, A. D.: *J. Appl. Microbiol.* **87**, 702 (1999).
16. Fraud, S.; Maillard, J.-Y.; Russell, A. D.: *J. Hosp. Infect.* **48**, 214 (2001).
17. Simons, C.; Walsh, S. E.; Maillard, Y.-J.; Russell, A. D.: *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 299 (2000).
18. Fraud, S.; Hann, A. C.; Maillard, J.-Y.; Russell, A. D.: *J. Antimicrob. Chemoth.* **51**, 575 (2003).
19. Cooke, R. P. D.; Goddard, S. V.; Whyment-Morris, A.; Sherwood, J.; Chatterly, R.: *J. Hosp. Infect.* **54**, 226 (2003).
20. Simões, M.; Pereira, M. O.; Vieira, M. J.: *Biofouling* **19**, 287 (2003).
21. Cabrera-Martinez, R.-M.; Setlow, B.; Setlow, P.: *J. Appl. Microbiol.* **92**, 675 (2002).
22. Zhu, P. C.; Roberts, C. G.; Favero, M. S.: *Curr. Org. Chem.* **9**, 1155 (2005).
23. Žabka, J.; Romanzin, C.; Alcaraz, Ch.; Polášek, M.: *Icarus* **219**, 161 (2012).
24. Waters: *Waters Micromass Quattro Premier XE Mass Spectrometer, Operator's Guide*, Milford, Waters Corporation 2006.
25. Armstrong, M.; Jonscher, K.; Reisdorph, N. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 2717 (2007).
26. McKerrow, J. D.; Al-Rawi, J. M. A.; Brooks, P.: *Synthetic Commun.* **40**, 1161 (2010).

27. CSID:674257, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.674257.html>
(zobrazeno 2. dubna 2014).
28. Huang, X.-H.: *Z. Kristallogr.* **228**, 27 (2013).
29. Breytenbach, J. C.; van Dyk, S.; van den Heever, I.; Allin, S. M.; Hodgkinson, C. C.; Northfield, C. J.; Page, M. I.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 1629 (2000).
30. Brady, F.; Gallagher, G. F.: *Acta Cryst.* **62**, 3348 (2006).